

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 3 月 6 日 (06.03.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/018842 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/68, C12N 15/52, C12Q 1/02, G01N 33/566, 33/50, A61K 38/44, A61P 35/00
- (74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒104-0061 東京都中央区銀座二丁目6番12号 大倉本館 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08524
- (22) 国際出願日: 2002 年 8 月 23 日 (23.08.2002)
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2001-254974 2001 年 8 月 24 日 (24.08.2001) JP
特願2002-116753 2002 年 4 月 18 日 (18.04.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.) [JP/JP]; 〒841-0017 佐賀県鳥栖市田代大官町 408 Saga (JP). 千葉県 (CHIBA-PREFECTURE) [JP/JP]; 〒260-8667 千葉県千葉市中央区市場町1番1号 Chiba (JP).
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中川原 章 (NAKAGAWARA, Akira) [JP/JP]; 〒260-0801 千葉県千葉市中央区仁戸名町666-2 千葉県がんセンター内 Chiba (JP). 宮崎 耕 (MIYAZAKI, Kou) [JP/JP]; 〒266-0031 千葉県千葉市緑区おゆみ野948-28 プロムナード201 Chiba (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL GENE NEDL-1

(54) 発明の名称: 新規な遺伝子 NEDL-1

(57) Abstract: Diagnostics and diagnostic kits for the prognosis of neuroblastoma which comprise a nucleic acid probe, a primer, etc. with the use of a nucleic acid originating in NEDL-1 gene or NEDL-1 protein; and a method of diagnosing the prognosis of neuroblastoma by using the same.

(57) 要約:

NEDL-1 遺伝子に由来する核酸、または NEDL-1 タンパク質を利用した核酸プローブ或いはプライマー等からなる神経芽細胞腫の予後の診断剤および診断用キット、並びにそれらを用いる神経芽細胞腫の予後の診断方法。

WO 03/018842 A1

BEST AVAILABLE COPY

明細書

新規な遺伝子 N E D L - 1

技術分野

5 本発明は、神経芽細胞腫において発現する遺伝子に由来する核酸類およびそれらがコードする遺伝子発現産物に関する。さらに詳しくは、本発明は、予後良好な神経芽細胞腫と、予後不良な神経芽細胞腫との比較において、予後良好な神経芽細胞腫で発現が増強されているマーカー遺伝子に由来する核酸およびその断片、並びにそれらの神経芽細胞腫の予後の診断への用途に関する。

10 背景技術

(腫瘍形成と遺伝子)

個々の腫瘍にはそれぞれの個性があり、発癌の基本的な原理は同じであっても、その生物学的特性は必ずしも同じではない。近年、癌の分子生物学や分子遺伝学が急速に進歩し、発癌やいわゆる腫瘍細胞のバイオ
15 ロジーが遺伝子レベルで説明できるようになってきた。

(神経芽細胞腫)

神経芽細胞腫は、末梢交感神経系細胞に由来する交感神経節細胞と副腎髄質細胞に発生する小児癌である。この交感神経系細胞は、発生初期の神経堤細胞が腹側へ遊走し、いわゆる交感神経節が形成される場所
20 で分化成熟したものである。その一部の細胞は、さらに副腎部へ遊走し、先に形成されつつある副腎皮質を貫通して髄質部に達し、そこで髄質を形成する。神経堤細胞は、ほかの末梢神経細胞の起源ともなっており、後根神経節(知覚神経)、皮膚の色素細胞、甲状腺C細胞、肺細胞の一部、腸管神経節細胞などへ分化する。

25 (神経芽細胞腫の予後)

神経芽細胞腫は多彩な臨床像を示すことが特徴である(中川原：神経

- 芽腫の発生とその分子機構 小児内科 30, 143, 1998)。例えば、1歳未満で発症する神経芽細胞腫は、非常に予後が良く、大部分が分化や細胞死を起こして自然退縮する。現在、広く実施されている生後6か月時の尿のマススクリーニングで陽性となる神経芽細胞腫の多くは、この自然退縮を起こしやすいものに属する。一方、1歳以上で発症する神経芽細胞腫は、悪性度が高く、多くの場合、治療に抵抗して患児を死に至らしめる。1歳以上の悪性度の高い神経芽細胞腫は、体細胞突然変異 (Somatic mutation) が起こり、モノクローナルであるのに対し、自然退縮する神経芽細胞腫では、生殖細胞突然変異 (germline mutation) のみの遺伝子変異でとどまっているとの仮説もある。Knudson AG等: Regression of neuroblastoma IV-S: A genetic hypothesis. N Engl J Med 302, 1254 (1980) を参照。
- 15 (神経芽細胞腫の予後を推定する遺伝子)
- 最近の分子生物学的研究の進展により、神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) の高親和性レセプターである Trk A の発現が分化と細胞死の制御に深くかかわっていることが明らかになってきた。Nakagawara A., The NGF story and neuroblastoma, Med Pediatr Oncol, 31, 113 (1998) を参照。Trk は膜貫通型レセプターでもあり、Trk-A、B、C の3つが主なものである。これら Trk ファミリー・レセプターは、中枢神経および末梢神経系において、特異的な神経細胞の分化と生存維持に重要な役割を果たしている。
- 20 中川原等: 神経芽細胞腫におけるニューロトロフィン受容体の発現と予後 小児外科 29: 425-432, 1997 を参照。腫瘍細胞の生
- 25

存や分化は、T r kチロシンキナーゼやR e tチロシンキナーゼからのシグナルで制御されている。なかでも、T r k Aレセプターの役割は最も重要で、予後良好な神経芽細胞腫ではT r k Aの発現が著しく高く、これからのシグナルが腫瘍細胞の生存・分化、または細胞死（アポトーシス）を強く制御している。一方、予後不良な神経芽細胞腫では、T r k Aの発現が著しく抑えられており、これに代わってT r k B或いはR e tからのシグナルが生存の促進という形で腫瘍の進展を助長している。

また、神経の癌遺伝子であるN-m y cの増幅が神経芽細胞腫の予後に関連していることも明らかになってきた。中川原：脳・神経腫瘍の多段階発癌, M o l e c u l a r M e d i c i n e, 3 6 4, 3 6 6 (1999) を参照。この遺伝子は神経芽細胞腫で初めてクローニングされたが、正常細胞や予後良好な神経芽細胞腫では通常1倍体当たり1つしか存在しないのに対し、予後不良の神経芽細胞腫においては数十倍に増幅されているのが見つかった。

しかしながら、現在までに、神経芽細胞腫に発現されている癌遺伝子は、N-m y c以外知られておらず、その予後の良不良に関する遺伝子情報に関しても、N-m y cとT r k A以外はほとんど知られていなかった。

発明の開示

本発明は、かかる事情に鑑みてなされたものであり、神経芽細胞腫の予後の良不良に係る遺伝子の塩基配列を明らかにし、その遺伝子情報に基づいて、神経芽細胞腫の予後の良不良に係る診断を可能とすることを目的とする。さらに、前記遺伝子の転写産物であるタンパク質の機能に関する情報を提供することを目的とする。

本発明者は上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、神経芽細胞腫の予後を検定し、予後良好および予後不良の臨床組織サンプルの各々

から cDNA ライブラリーを作成することに成功した。これら 2 種類の cDNA ライブラリーから各々約 2400 クローンをクローニングし、神経芽細胞腫の予後の良悪によって分類し、それぞれのサブセットでプロファイリングを行った。

- 5 そこで、本発明者は、前記サブセット間で示差的に発現し、かつ予後の良好な臨床組織サンプルでのみ高発現を示す遺伝子群を見出し、その一つを NEDL-1 (nb1a0078) と名付けた。さらに、本発明者は NEDL-1 遺伝子の全長をシークエンスし、それがコードする NEDL-1 タンパク質の機能解析を行ったところ、HECT 型ユビキチンリガーゼであることが判明した。

- 10 かかる知見に基づき、本発明者は、神経芽細胞腫の予後良好な臨床組織でのみ発現が増強している遺伝子を検出およびクローニングするための遺伝子情報(塩基配列情報等)を提供することを可能とした。さらに、前記塩基配列情報に基づき、予後の診断方法およびそのために使用可能な診断剤等を提供することを可能とし、本発明を完成した。

15 すなわち、本発明によれば以下の(a)または(b)の核酸を含む核酸プローブが提供される：

(a)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸；

- 20 (b)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸。

好ましくは、前記核酸プローブにおいて、核酸が DNA である。

- 25 また好ましくは、上記核酸プローブにおいて、核酸が少なくとも 20 個の塩基長である。

さらに好ましくは、上記核酸プローブにおいて、前記配列表の配列番

号 2 に示す塩基配列がその全長である。

また、本発明によれば上記の核酸プローブを有効成分とする神経芽細胞腫の予後診断剤が提供される。

5 また、本発明によれば以下の(a)または(b)のDNAを含むプライマーが提供される：

(a)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有するDNA；

10 (b)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、またはそれと相補的な塩基配列を有するDNA。

また、本発明によれば上記のプライマーを有効成分とする神経芽細胞腫の予後キットが提供される。

15 さらに、本発明によれば神経芽細胞腫の臨床組織サンプルから配列表の配列番号 2 に示す塩基配列からなる核酸の有無を検出することを特徴とする、神経芽細胞腫の予後の診断方法が提供される。

また、本発明によれば神経芽細胞腫の臨床組織サンプルから配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の有無を神経芽細胞腫の臨床組織サンプルから検出することを特徴とする、神経芽細胞腫の予後の診断方法が提供される。

20 加えて、本発明によれば(a)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸、または(b)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸を神経芽細胞腫の臨床組織サンプルと接触させて、配列表の配列番号 1 に示す
25 アミノ酸配列からなるタンパク質の発現およびその量を分析することを特徴とする神経芽細胞腫の予後の診断方法が提供される。

従って、上記の核酸およびタンパク質は、予後良好な神経芽細胞腫と、予後不良な神経芽細胞腫との比較において、予後良好な神経芽細胞腫でのみ発現が増強されているマーカー遺伝子に由来するものであり、該核酸およびタンパク質の配列に関する情報は神経芽細胞腫の予後の診断を可能にすることを特徴とする。

さらに、本発明によれば配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を有効成分として含むポリユビキチン化剤が提供される。

前記ポリユビキチン化剤において、好ましくはユビキチン化される基質がアミロイド β 前駆蛋白 (β APP)、アミロイド β 前駆蛋白細胞内領域 (AICD) またはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) 変異体である。

また、本発明によればアミロイド β 前駆蛋白 (β APP) の調節用組成物であって、配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をアミロイド β 前駆蛋白の細胞内での発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物が提供される。

また、本発明によればアミロイド β 前駆蛋白 (β APP) の調節用組成物であって、配列表の配列番号 2 に示す塩基配列を有する核酸をアミロイド β 前駆蛋白の細胞内での発現、産生、または形成を調節するのに有効な量含むことを特徴とする調節用組成物が提供される。

さらに、本発明によれば細胞に配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をアミロイド β 前駆蛋白 (β APP) の細胞内発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内でのアミロイド β 前駆蛋白の発現、産生、または形成を調節する方法が提供される。

また、本発明によれば細胞に配列表の配列番号 2 に示す塩基配列を有する核酸をアミロイド β 前駆蛋白 (β APP) の細胞内発現、産生、ま

たは形成を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内でのアミロイド β 前駆蛋白(β APP)の発現、産生、または形成を調節する方法が提供される。

5 また、本発明によればスーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性の調節用組成物であって、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をスーパーオキシドジムスターゼ活性を細胞内で調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物が提供される。

10 また、本発明によればスーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性の調節用組成物であって、配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をスーパーオキシドジムスターゼ活性を細胞内で調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物が提供される。

15 さらに、細胞に配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をスーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内におけるスーパーオキシドジムスターゼ活性を調節する方法が提供される。

 また、本発明によれば細胞に配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をスーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内におけるスーパーオキシドジムスターゼ活性を調節する方法が提供される。

20 上記スーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性の調節用組成物および細胞内におけるスーパーオキシドジムスターゼ活性を調節する方法において、好ましくはSOD1がその変異型である。

図面の簡単な説明

25 図1Aは、HECT型ユビキチンリガーゼ類のタンパク質構造を模式的に示す図であり、いずれもC末端側にHECTドメイン、中央部に複数のWWドメイン、N末端側にC2ドメインを有することを示している。

図1Bは、NEDL-1タンパク質のアミノ酸配列とNEDL2タンパク質のアミノ酸配列とのホモロジー解析を表すアラインメント図である。前記各ドメインは、下線を施すか、箱で囲まれて表示されている。また、保存アミノ酸は、星印で表示されている。

5 図2は、半定量的RT-PCRによって、予後良好・不良神経芽細胞腫の臨床組織サンプルにおけるNEDL-1遺伝子の発現を測定した結果を示す電気泳動図である。

図3Aは、半定量的RT-PCRによって、正常ヒト組織におけるNEDL-1遺伝子の発現を測定した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。

図3Bは、半定量的RT-PCRによって、各種の神経芽細胞腫株におけるNEDL-1遺伝子の発現を測定した結果を示す電気泳動写真に対応する図である。

15 図4は、正常ヒト組織におけるNEDL-1遺伝子の組織別発現をノーザンブロットによって分析したオートラジオグラフィーを表す図である。

図5は、NEDL-1タンパク質のユビキチンリガーゼ活性を示すイムノブロットした電気泳動図である。

20 図6Aは、NEDL-1遺伝子の細胞内局在化を表すウェスタンブロット図である(Cos7細胞)。

図6Bは、NEDL-1遺伝子の細胞内局在化を表すウェスタンブロット図である(CHP134細胞)。

25 図7は、NEDL-1タンパク質のAICDとの相互作用を示すイムノブロットした電気泳動図であり、抗NEDL-1抗体で免疫沈降させ、抗FLAG抗体で検出したものである。

図8は、NEDL-1タンパク質のAICDとの相互作用を示すイム

ノブロットした電気泳動図であり、抗FLAG抗体で免疫沈降させ、抗NEDL-1抗体で検出したものである。

5 図9Aは、NEDL-1タンパク質の β APPおよびAICDに対するユビキチン化を示すイムノブロットした電気泳動図であり、抗HA抗体で免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体で検出したものである。

図9Bは、NEDL-1タンパク質のFLAG-AICDに対するユビキチン化を示すイムノブロットした電気泳動図であり、抗FLAG抗体で免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体で検出したものである。

10 図10は、NEDL-1タンパク質の β APPおよびAICDに対するユビキチン化を示すイムノブロットした電気泳動図であり、抗HA抗体で免疫沈降させ、AICDを認識する抗体で検出したものである。

図11は、NEDL-1タンパク質のSOD1変異体との相互作用を示すイムノブロットした電気泳動図であり、抗NEDL-1抗体で免疫沈降させ、抗FLAG抗体で検出したものである。

15 図12は、NEDL-1タンパク質のSOD1変異体との相互作用を示すイムノブロットした電気泳動図であり、抗FLAG抗体で免疫沈降させ、抗NEDL-1抗体で検出したものである。

図13は、NEDL-1タンパク質のSOD1およびSOD1変異体に対するユビキチン化を示すイムノブロットした電気泳動図である。

20 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明に係る予後良好な神経芽細胞腫に高発現する遺伝子（以下、「本発明のNEDL-1遺伝子」或いは単に「NEDL-1遺伝子」という）に由来する核酸（以下、「本発明に係る核酸」という）、および該遺伝子がコードするタンパク質（以下、NEDL-1タンパク質とい

25 う）について本発明の好適な実施の形態を参照して、詳細に説明する。

本発明に係る核酸は、上述のごとく本発明のNEDL-1遺伝子に由

来するものであり、該遺伝子を構成するか或いは該遺伝子からインビボまたはインビトロの過程によって得られる。該核酸の塩基長に特に制限はなく、ここでは前記遺伝子の一部に対応する核酸断片も含めて本発明に係る核酸という。塩基長が短い場合、その核酸は化学的手法で合成することができる。本明細書で使用する「核酸」という用語は、例えばDNAまたはRNA、或いはそれから誘導された活性なDNAまたはRNAであるポリヌクレオチドを指し、好ましくは、DNAまたはRNAを意味する。特に好ましい核酸は、本明細書中に開示されるヒトcDNA配列と同一か、またはそれと相補的な配列を有する。

また、本明細書で使用する「ストリンジントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、2つの核酸（または断片）が、サムブルックら（Sambrook, J.）の「大腸菌におけるクローン遺伝子の発現（Expression of cloned genes in E. coli）」、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 9.47-9.62および11.45-11.61に記載されたハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する。

より具体的には、前記「ストリンジントな条件」とは、約45℃において6.0xSSCでハイブリダイゼーションを行った後に、50℃において2.0xSSCで洗浄することを指す。ストリンジェンシーの選択のため、洗浄工程における塩濃度を、例えば低ストリンジェンシーとしての約2.0xSSC、50℃から、高ストリンジェンシーとしての約0.2xSSC、50℃まで選択すること、ができる。さらに、洗浄工程の温度を低ストリンジェンシー条件の室温、約22℃から、高ス

トリンジェンシー条件の約 65℃まで高くすることもできる。

また、本明細書で使用する「核酸」という用語は、単離された核酸を指し、これは組換え DNA 技術により作製された場合は細胞物質、培養培地を実質的に含有せず、化学合成された場合には前駆体化学物質またはその他の化学物質を実質的に含まない、核酸またはポリヌクレオチドを指す。

また、本明細書で使用する「予後良好」とは、神経芽細胞腫のうち、腫瘍が限局して存在するか、または退縮や良性の交感神経節細胞腫になった状態を指し、これは N-myc その他の腫瘍マーカー (TrkA、染色体異常等) から判断して、悪性度が低いと医師によって判断される。本発明の好適な実施の形態では、病期 1 または 2、発症年齢が 1 歳未満、手術後 5 年以上再発なく生存し、臨床組織中に N-myc の増幅が認められない症例を予後良好としたが、このような特定の例には限定されない。また、本明細書で使用する「予後不良」とは、神経芽細胞腫のうち、腫瘍の進行が認められる状態を指し、これは N-myc その他の公知の腫瘍マーカーから判断して、悪性度が高いと医師によって判断される。本発明の好適な実施の形態では、病期 4、発症年齢が 1 歳以上、手術後 3 年以内に死亡、臨床組織サンプル中に N-myc の増幅が認められた症例を予後不良としたが、このような特定の例には限定されない。

神経芽細胞腫は、ヒトでは 2 種類しか知られていない神経細胞そのものの腫瘍の 1 つであり、そこで発現している遺伝子を解析することは、神経細胞のバイオロジーを理解する上で非常に有用な知見をもたらすものと考えられる。すなわち、脳や末梢神経から、部位特異的な均質な組織を得ることは極めて困難で、事実上不可能である。一方、神経芽細胞腫は、末梢交感神経細胞に由来するほぼ均一な神経細胞集団 (腫瘍化してはいるが) から成り、均質に発現している神経関連遺伝子が得られる

可能性が高い。また、神経芽細胞腫は癌であるため、神経発生の未熟な段階で発現している重要な遺伝子が多いことも特徴として挙げられる。

さらに、神経芽細胞腫は、予後の良好なものと予後の不良なものとのが臨床的、生物学的にはっきり区別される。予後良好な神経芽細胞腫の癌細胞は、増殖速度が極めて遅く、ある時点から自然退縮を始めることが特徴である。これまでの知見から、この自然退縮では、神経細胞の分化およびアポトーシス（神経細胞死）が起こっており、正常神経細胞の成熟段階で起こる分化とプログラム細胞死と非常によく似た現象であることが分かってきた。従って、この腫瘍で発現している遺伝子を解析することによって、神経の分化やアポトーシスに関連した重要な遺伝子情報を入手できる可能性が極めて高い。

上記の有用な遺伝子情報を入手できる遺伝子であるNEDL-1遺伝子およびそれがコードするNEDL-1タンパク質は、予後良好な神経芽細胞腫の臨床組織に見出されたものであり、かかる遺伝子およびタンパク質は以下のような特徴を有する。

本発明のNEDL-1遺伝子は全長6200塩基（コード領域4755塩基）を有する遺伝子であり、その塩基配列を配列表の配列番号2に示す。該遺伝子がコードするNEDL-1タンパク質は、1585個のアミノ酸からなり、その全長を配列表の配列番号1に示す。なお、前記塩基配列およびアミノ酸配列は、GeneBank (HYPERLINK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)に受理番号AB048365として登録されている。

本発明者は、NEDL-1遺伝子およびNEDL-1タンパク質の構造・機能解析の結果から、NEDL-1がHECT型ユビキチンリガーゼであることも見出した。HECT型ユビキチンリガーゼ・ファミリーの一員であることが知られているKIAA0322タンパク質 (NED

L2)とNEDL-1タンパク質とのホモロジー解析の結果を図1に示す。NEDL-1タンパク質は、HECT型ユビキチンリガーゼの特徴である以下のドメインを有する。すなわち、(1)C末端領域にHECTドメイン(約300アミノ酸)、NEDL-1で1280~1585位;(2)
5 中央部に複数個のWWドメイン(約35~40アミノ酸)、NEDL-1で807~841位と998~1030位、NEDL2で806~840位;(3)N末端領域にカルシウム依存的に膜脂質に結合するC2ドメイン、NEDL-1で185~295位、NEDL2で186~295位である。さらに、NEDL-1タンパク質は、HECT型ユビキチンリ
10 ガーゼであるNedd4と同程度のユビキチンリガーゼ活性を示すことが分かった。

タンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム系で分解されているので、このシステムは適正な細胞プロセスに必須のものである。簡単には、該システムは分解すべき標的タンパク質にユビキチン分子(Ub)を多数
15 結合させ(ポリユビキチン化またはユビキチン化という)、ユビキチン化されたタンパク質は26Sプロテアソームによって分解される。タンパク質のユビキチン化は、一連の酵素群、すなわちユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチン連結酵素(ユビ
キチンリガーゼ)(E3)の触媒作用によって進行することが明らかにされている(例えば総説として、実験医学、田中啓二「ユビキチンとプロ
20 テアソーム」18巻、11号、1452~1456頁、2000年(羊土社)を参照)。このうち、ユビキチンリガーゼ(E3)がE2-UbからUbを受け取り、このUbを標的タンパク質(基質)に連結させる。したがって、ユビキチンリガーゼが特定のタンパク質をユビキチン化する
25 特異性に最も関与すると考えられている。

ユビキチン-プロテアソーム系の異常(ユビキチン代謝異常)は、多

くの疾患と関連していることが指摘されてきた (R. J. Mayerら、
Biochem. Biophys. Acta 1089: 141-157
(1991))。最近、神経変性疾患とユビキチン代謝異常の関係が注目
されてきており、ユビキチンリガーゼとして知られている E6-AP が
5 アンジェルマン症候群の責任遺伝子の 1 つであることが報告されている
(実験医学、本多慶臣ら「HECT型ユビキチン連結酵素：生理機能と
病態」18巻、11号、1483~1490頁、2000年(羊土社))。
したがって、HECT型ユビキチンリガーゼの一種である本発明の NEDL-1
タンパク質も神経組織に高発現されることから、神経変性疾患
10 の原因遺伝子産物を基質とすることが充分予想される。それらの原因遺
伝子産物は、アルツハイマー病におけるアミロイド β 前駆蛋白 (β APP)
およびプレセリニンタンパク質 (PS) 等が考えられる。

実際、後述の実施例に記載されているように、NEDL-1 がアミロ
イド前駆蛋白のコード領域であるアミロイド β 前駆蛋白細胞内領域 (A
15 ICD-amyloid beta precursor intracellular domain) と相互作用する
ことが見出された。この相互作用は、さらに NEDL-1 が BAPP お
よび AICD をユビキチン化することによるものであることが確かめら
れた。

アミロイドは、アルツハイマー病患者の脳血管や老人斑に異常なレベ
20 ルで沈着する蛋白であるが、これは主に分子量 4 kDa の β 蛋白から構成
されており、アミロイド前駆蛋白がセクレターゼで切り出されることで
産生される。NEDL-1 と AICD が直接相互作用するという事実は、
NEDL-1 が β APP (さらに β -アミロイド) の産生を直接或いは間
接的に制御している可能性があり、 β -アミロイドの産生低下を分子標的
25 としたアルツハイマー病治療戦略を考慮する上で極めて重要な知見とな
る。

また、後述の実施例に記載されているように、N E D L - 1 はスーパーオキシドジスムターゼ (S O D 1) 変異体と相互作用することが見出された。これは、さらに N E D L - 1 が S O D 1 変異体をユビキチン化することによるものであることが確かめられた。

5 筋萎縮性側索硬化症 (A L S) は、運動ニューロンの変性・脱落により筋萎縮を生じる、予後不良の神経変性疾患である。現在、家族性の A L S は、A L S 全体の 5 ~ 1 0 % の頻度で認められるが、その一部の家系でその原因遺伝子が、C u / Z n スーパーオキシドジスムターゼ (S O D 1) 遺伝子であることが判明している。S O D 1 は、好気性代謝の
10 過程で細胞内に生じる活性酵素の一種である スーパーオキサイドを不活化する酵素であり、この低下により、神経細胞が変性する可能性はあるものの、その機序の詳細は不明である。その他の一般的な筋萎縮性側索硬化症についても、原因は不明である。

現在、ウイルス説、中毒説、神経栄養因子の欠乏説、自己免疫性説、
15 グルタミン酸過剰説、フリーラジカル説などが考えられているが A L S で、運動神経のみが変性する病理機序については、まだ決定的なものは判明していない。近年、変異 S O D 1 が細胞内で凝集体を形成し、細胞毒性を発揮するという凝集体仮説が最も有力なものとされつつある。

現在 S O D 1 の変異体は約 8 0 個報告されているが、これら変異体の
20 いずれも細胞内の情報伝達経路は不明なままである。変異 S O D 1 2 種 (G 8 5 R / G 9 3 A) については相互作用分子の報告があり、これらの変異体とのみ結合し、正常 S O D 1 とは結合しない蛋白因子としては、lysyl-tRNA synthetase と translocon-associated protein delta の 2 種類のみが判明しているだけであり (Kunst CB, Mezey E, Brownstein MJ,
25 Patterson D. Mutations in SOD1 associated with amyotrophic lateral sclerosis cause novel protein interactions. Nat Genet. 1997

Jan;15(1):91-4.)、その詳細は未だ解明されていない。このようにALSが初めて報告されてから約130年経過する現在でも変異SOD1が新たに獲得するとされる細胞毒性の細胞内情報伝達経路の解明は行き詰まりともいえる状況である。以上の現況を考慮すると本発明で得られた結果は、未だ解明されていないALSの発症メカニズムの解明に極めて重要な知見を提供しているといえる。

NEDL-1タンパク質は、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を有するが、本発明は、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を有するタンパク質をも包含する。

また、本発明にはNEDL-1タンパク質等の塩も包含される。このような塩としては特に制限はないが、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩が好ましい。

また、多くのタンパク質には糖鎖が付加され、アミノ酸を1若しくは複数変換することにより糖鎖の付加を調節することができる。従って、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において、前記糖鎖の付加を調節されたタンパク質も本発明に包含される。

また、NEDL-1タンパク質をコードする塩基配列を有する核酸も本発明に含まれる。ここで、「タンパク質をコードする」とは、DNAが2本鎖である場合には、相補2本鎖のいずれか一方がタンパク質をコードする塩基配列を有することを意味するため、本発明に係る核酸には配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を直接コードする塩基配列からなる核酸、若しくはその相補的な塩基配列からなる核酸をも包含される。

さらに、本発明に係る核酸は、配列番号2に示す塩基配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸であってもよく、この条件を満たす限りにおいてはその塩基配列は特に制限されない。

さらに、本発明の核酸には前記ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸に相補的な塩基配列を有する核酸も包含され、具体的には、例えば、配列番号 2 に示す塩基配列を有する核酸または前記核酸に相補的な塩基配列を有する核酸の塩基のいくつかに欠失、置換、挿入、付加
5 がある核酸が挙げられる。ここで、欠失、置換、挿入、付加とは、1 ～ 10 塩基の短い欠失、置換、挿入、付加のみならず、10 ～ 100 塩基の長い欠失、置換、挿入、付加も含む。

神経芽細胞腫の予後良好なものと、不良なものととの臨床組織サンプルにおける本発明の N E D L - 1 遺伝子の発現量を比較した結果、顕著な
10 差が認められた。すなわち、この遺伝子は、予後良好な神経芽細胞腫で発現が増強されていた。したがって、配列番号 2 に示す塩基配列は、上記の様々な有用な遺伝子情報以外に、その配列を有する核酸（DNA または RNA）を検出することによって神経芽細胞腫の良不良を診断する腫瘍マーカーの情報として利用可能である。また、配列番号 1 に示すア
15 ミノ酸配列も、その配列情報に基づいて本発明の N E D L - 1 タンパク質を検出することによって神経芽細胞腫の良不良を診断する腫瘍マーカーの情報として利用可能である。

すなわち、本発明は、本発明の N E D L - 1 遺伝子および N E D L - 1 タンパク質を用いて、神経芽細胞腫およびそれに関連する様々な遺伝
20 子情報を以下の手段により得ることを可能とする。

（１） ハイブリダイゼーションに用いるプローブ

本発明の 1 つの実施の形態に従えば、本発明に係る核酸をハイブリダイゼーションのプローブ（すなわち、本発明の核酸プローブ）として使用することによって、神経芽細胞腫で発現している本発明の N E D L -
25 1 遺伝子を検出することが可能である。さらに、本発明に係る核酸をハイブリダイゼーションのプローブとして使用し、様々な腫瘍、正常組織

における遺伝子発現を調べることによって、該遺伝子発現の分布を同定することも可能である。

本発明に係る核酸をハイブリダイゼーションのプロープとして使用する
場合、ハイブリダイゼーション法自身については、特に限定はない。

5 好適な方法として、例えば、ノザンハイブリダイゼーション、サザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション、ドットハイブリダイゼーション、Fluorescence in situ hybridization (FISH)、in situ hybridization (ISH)、DNAチップ法、マイクロアレイ法等が挙げ
10 られる。

前記ハイブリダイゼーションの1つの応用例として、本発明に係る核酸をノザンハイブリダイゼーションのプロープとして用い、検定したい臨床組織サンプル中においてmRNAの長さを測定することや、本発明のNEDL-1遺伝子発現を定量的に検出することが可能である。

15 また別の応用例として、本発明に係る核酸をサザンハイブリダイゼーションのプロープとして用い、検定したい臨床組織サンプルのゲノムDNA中、該DNA配列の有無を検出することが可能である。

さらに別の応用例として、本発明に係る核酸をFISH法のプロープとして用い、本発明のNEDL-1遺伝子の染色体上の位置を同定することも可能である。
20

さらに別の応用例として、本発明に係る核酸をISH法のプロープとして用い、本発明のNEDL-1遺伝子の発現の組織分布を同定することも可能である。

25 本発明に係る核酸をハイブリダイゼーション用プロープとして使用する
場合、少なくとも20個の塩基長が必要であり、本発明に係る核酸のうち、20個以上の連続した塩基からなる核酸が好ましく用いられる。

より好ましくは、40個以上の連続した塩基からなる核酸が用いられる。
特に好ましくは、60個以上の連続した塩基からなる核酸が用いられる。
さらに、配列番号2に示す塩基配列の全長からなる核酸を用いてもよい。

当業者にとって、上記各種のハイブリダイゼーションにおける核酸プロ
5 ープ技法は周知であり、例えば、個々の長さの本発明の核酸プロ
と、目的とするポリヌクレオチドとの適当なハイブリダイズ条件は容易
に決定することができる。種々の長さを含むプローブに対し至適なハイ
ブリダイズ条件を得るためのかかる操作は、当業者では周知であり、例
例えばサンプルックら、Molecular Cloning: A La
10 boratory Manual (前掲)を参照して、行えばよい。

好ましくは、本発明の核酸プローブは、容易に検出されるように標識
される。検出可能な標識は、目視によって、または機器を用いるかのい
ずれかによって検出され得るいかなる種類、元素または化合物であって
もよい。通常使用される検出可能な標識としては、放射性同位元素、ア
15 ビジンまたはビオチン、蛍光物質 (FITCまたはローダミン等) が挙
げられる。前記放射性同位元素は、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{35}S 等である。
また、ビオチン標識ヌクレオチドは、ニックトランスレーション、化学
的または酵素的手段によって、核酸に組み込むことができる。ビオチン
標識されたプローブは、アビジン/ストレプトアビジン、蛍光標識、酵
20 素、金コロイド複合体等などの標識手段を使用したハイブリダイゼー
ションの後検出される。また、本発明の核酸プローブは、タンパク質と結
合させることによって標識されてもよい。その目的で、例えば放射性ま
たは蛍光ヒストン一本鎖結合タンパク質が使用される。このようにして、
適当に標識されたプローブは、本発明の予後診断剤を構成する。

25 (2) PCRに用いるプライマー

本発明のNEDL-1遺伝子を検出するには上記のハイブリダイゼー

5 ション法の他に、本発明に係る核酸に含まれる任意の核酸（DNA）配列からプライマーを設計して、Polymerase Chain Reaction（PCR）法を用いることにより可能である。例えば、検定したい臨床組織サンプルからmRNAを抽出し、RT-PCR法により遺伝子発現を半定量的に測定することが可能である。このような方法は、当業者にとって周知の方法に従って行われるが、例えば、サンプル
10 ックから、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（前掲）、および遺伝子病入門（高久史磨著：南江堂）が参照される。

10 本発明に係る核酸（DNA）をPCR用プライマー（すなわち、本発明のプライマー）として使用する場合、10ないし60個の塩基長が必要であり、本発明に係る塩基配列の一部であって、10ないし60個の連続した塩基を有する核酸が好ましく用いられる。より好ましくは、15
15 5ないし30個の塩基を有するものが用いられる。また一般的には、プライマー配列中のGC含量が40ないし60%のものが好ましい。さらに、増幅に用いる2つのプライマー間のT_m値に差がないことが望まれる。また、プライマーの3'末端でアニールせず、プライマー内で2次構造をとらないことも望ましい。

（3）遺伝子のスクリーニング

20 本発明に係る核酸を使用することによって、様々な組織や細胞で発現している本発明のNEDL-1遺伝子の発現分布を検出することが可能である。これは例えば、本発明に係る核酸を上記のようにハイブリダイゼーションのプローブ、またはPCRのプライマーとして使用することによって、可能となる。

25 また、DNAチップ、マイクロアレイ等を用いても遺伝子の発現分布を検出することが可能である。すなわち、本発明に係る核酸を直接、前

記チップ、アレイ上に張り付けことが出来る。チップ、アレイに張り付けるために、高精度分注機でかかる核酸等（DNA）を基板にスポットする方法が知られている（例えば、米国特許第5807522号を参照）。そこに臨床組織サンプルから抽出したmRNAを蛍光物質などで標識し、
5 ハイブリダイズさせ、その遺伝子がどのような組織の細胞で高発現しているかを解析することが可能である。またチップ、アレイ上に張り付けるDNAは、本発明の核酸またはその断片をプローブとして用いたPCRの反応産物であってもよい。別法として、本発明の核酸断片（DNA断片）を基板上で直接合成してDNAチップ若しくはアレイとすることも
10 できる（例えば、米国特許第5424186号を参照）。

（４）腫瘍の予後診断の方法およびそのために使用可能な腫瘍マーカー

上述のように本発明のNEDL-1遺伝子は、予後良好な神経芽細胞腫で発現が増強されていた。そこで、本発明に係る核酸をハイブリダイゼーションのプローブ或いはPCRのプライマーとして使用し、被験者
15 から採取した、臨床組織を含むサンプル中で、前記遺伝子の発現の増強の有無を調べることにより予後診断が行える。遺伝子の検出方法としては、前述のノーザンブロットハイブリダイゼーション法、インサイチュハイブリダイゼーション法、およびRT-PCR法等が挙げられる。

20 ハイブリダイゼーション法を用いるとき、サンプル中で前記核酸プローブとハイブリダイズする核酸の量が増強する場合、予後が良好であると診断できる。また、RT-PCR法を用いるとき、サンプルからmRNAを抽出し、これをDNAに逆転写して、前記プライマーにより増幅するRT-PCR法を用いて、遺伝子発現を半定量的に測定する。この
25 ようにして遺伝子発現の増強が認められる場合、予後が良好であると診断できる。この特定の診断目的のためには、該プライマーを必須成分と

して一組含有する診断用キットを用いることが好ましい。該診断用キットは、プライマー成分以外に、PCR用の緩衝液、洗浄液、および酵素等の公知の成分を含む。

(6) アンチセンスオリゴヌクレオチド

5 本発明の別の実施の形態に従えば、本発明に係る核酸に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドが提供される。前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、本発明に係る核酸にハイブリダイズすることが可能であり、アンチセンスDNAとアンチセンスRNAとを含む。アンチセンスDNAは、DNAからmRNAへの転写を阻害し、アンチセンスRNAは、
10 mRNAの翻訳を阻害する。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、自動合成機を使用して、または本発明に係る核酸を鋳型とするPCR法により合成できる。さらに、該アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNAやmRNAとの結合力、組織選択性、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性が高められたアンチセンスオリゴヌクレオチド
15 誘導体をも包含する。このような誘導体は、公知のアンチセンス技術を用いて、合成することができる。

 mRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の配列に相補的な配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、該RNAの合成を阻止することができ、特に遺伝子の発現抑制効果が高い。従って、本発明は、かかるアンチセンスオリゴ
20 ヌクレオチドを好適に包含する。

(6) 遺伝子治療

 本発明の別の実施の形態に従えば、遺伝子治療に用いられる治療用遺伝子をコードする核酸配列が提供される。そこで、本発明に係る核酸を
25 遺伝子運搬に使用されるベクターに導入して、任意の発現プロモーターにより導入遺伝子（本発明のNEDL-1遺伝子）を発現させ、例えば

神経変性疾患の遺伝子治療に用いることができる。

1. ベクター

導入されうるウイルスベクターは、DNAまたはRNAウイルスをもとに作製できる。このようなベクターは、MoMLVベクター、ヘルペスウイルスベクター、アデノウイルスベクター、AAVベクター、HIVベクター、SIVベクター、センダイウイルスベクター等のいかなるウイルスベクターであってもよい。また、ウイルスベクターの構成タンパク質群のうち1つ以上を、異種ウイルスの構成タンパク質に置換する、もしくは、遺伝子情報を構成する核酸配列のうち一部を異種ウイルスの核酸配列に置換する、シュードタイプ型のウイルスベクターも本発明に使用できる。例えば、HIVの外皮タンパク質であるEnvタンパク質を、小水痘性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis Virus: VSV) の外皮タンパク質であるVSV-Gタンパク質に置換したシュードタイプウイルスベクターが挙げられる [Naldini L等: Science 272 263- (1996)]。さらに、治療効果を持つウイルスであれば、ヒト以外の宿主域を持つウイルスもウイルスベクターとして使用可能である。ウイルス以外のベクターとしてはリン酸カルシウムと核酸の複合体、リボソーム、カチオン脂質複合体、センダイウイルスリボソーム、ポリカチオンを主鎖とする高分子キャリアー等が使用可能である。さらに遺伝子導入系としてはエレクトロポレーション、遺伝子銃等も使用可能である。

2. 発現プロモーター

さらに、治療用遺伝子に用いられる発現カセットは、標的細胞内で遺伝子を発現させることができるものであれば、特に制限されることなくいかなるものでも用いることができる。当業者はそのような発現カセットを容易に選択することができる。好ましくは、動物由来の細胞内で遺

伝子発現が可能な発現カセットであり、より好ましくは、哺乳類由来の細胞内で遺伝子発現が可能な発現カセットであり、特に好ましくは、ヒト由来の細胞内で遺伝子発現が可能な発現カセットである。発現カセットに用いられる遺伝子プロモーターは、例えばアデノウイルス、サイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、シミアンウイルス 40、ラウス肉腫ウイルス、単純ヘルペスウイルス、マウス白血病ウイルス、シンピスウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、パピローマウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス、インフルエンザウイルス、日本脳炎ウイルス、JCウイルス、バルボウイルス B19、ポリオウイルス等のウイルス由来のプロモーター、アルブミン、SR α 、熱ショック蛋白、エロンゲーション因子等の哺乳類由来のプロモーター、CAGプロモーター等のキメラ型プロモーター、テトラサイクリン、ステロイド等によって発現が誘導されるプロモーターを含む。

(7) 医薬品

本発明の別の実施の形態として、医薬品に用いられる治療用タンパク質及びペプチドが提供される。本発明を実施する際に考慮されるように、本発明のNEDL-1タンパク質およびその一部であるペプチドを任意の調製法にて調製し、任意の投与法、投与量にて用いることで、例えば各種悪性腫瘍、或いは神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）の治療に用いることができる。

1. 調製法

医薬品は、例えば上記に示すような治療用にデザインされた薬物遺伝子を含む組換えウイルスベクターとして調製される。より具体的に言えば、NEDL-1遺伝子を含む組換えウイルスベクターを、水、生理食塩水、等張化した緩衝液等の適当な溶媒に溶解することで調製できる。また任意に製造されたNEDL-1タンパク質を同様に水、生理食塩水、

等張化した緩衝液等の適当な溶媒に溶解することで調製することも可能である。その際、ポリエチレングリコール、グルコース、各種アミノ酸、コラーゲン、アルブミン等を保護材として添加しても調製可能である。

2. 投与法、投与量

5 上記医薬品の生体への投与の方法については特に制限はない。例えば非経口的投与、例えば注射投与することにより好ましく実施できる。その医薬品の使用量は、その使用方法、使用目的等により異なり、当業者は容易に適宜選択最適化することが可能である。例えば、注射投与して用いる場合には、1日量約0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 1000 mg/kg を投与するのが好ましく、より好ましくは、1日量約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 100 mg/kg である。

(8) 抗体、アンチセンス、リボザイム、TFO

15 本発明のさらに別の実施の形態として、本発明のNEDL-1タンパク質のユビキチンリガーゼ活性を抑制する抗体、及び本発明のNEDL-1遺伝子の発現を抑制するアンチセンス、リボザイム、TFO等の塩基配列が提供される。本発明を実施する際に考慮されるように、これらのアンチセンス、リボザイム、TFOをコードする核酸を遺伝子運搬に使用されるベクターに導入して、任意の発現プロモーターにより導入遺伝子を発現させ、例えば初代培養細胞の株化や癌のモデル動物作製に用

20 いることができる。

(9) 遺伝子改変動物

25 本発明のさらに別の実施の形態として、本発明のNEDL-1遺伝子の発現をノックアウトする核酸配列、及びノックアウト動物（ノックアウトマウス等）が提供される。また、前記遺伝子を強制発現したトランスジェニック動物（トランスジェニックマウス等）、遺伝子に点変異や欠失等の任意の変異を導入した変異遺伝子が導入された遺伝子改変動物等

が提供される。このような遺伝子改変動物は、例えば神経変性疾患のモデル動物作製に用いることができる。

5 以上説明したように、本発明の N E D L - 1 遺伝子またはタンパク質若しくはこれらから得られる情報を利用することにより、臨床組織サンプルから該 N E D L - 1 遺伝子を検出することが可能となり、神経芽細胞腫の予後の良悪の診断が可能となる。また、前記遺伝子若しくはタンパク質、またはこれらから得られる情報を利用することにより、予後の診断方法および前記方法に使用可能な腫瘍マーカーを設計することが可能となる。

10 以下、実施例に即してさらに詳しく説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例に限定されるものではない。

(実施例)

(製造例 1) 神経芽細胞腫からの c D N A ライブラリーの構築

1. 試料入手

15 神経芽細胞腫の臨床組織サンプルを手術摘出直後に準無菌的に凍結し、その後 - 8 0 °C に保存した。

2. 予後良好な試料の選別

1 で得られた試料について予後の検定を以下の指標をもとに行った。

予後良好：

予後不良：

20 ・ 病期 1 または 2
・ 発症年齢が 1 歳未満

・ 病期 4
・ 発症年齢が

1 歳以上

・ 手術後 5 年以上再発なく生存

・ 手術後 3 年以

内に死亡

25 ・ N - m y c の増幅なし

・ N - m y c

増幅あり 上記 2 つの試料において、N - m y c 増幅は下記のようにして

確認した。

上記1で得られたサンプルを剃刀で細かく切断し、5 mlのTENバッファ（50 mM Tris-HCl (pH=8.0) / 1 mM EDTA / 100 mM NaCl）を加えよくホモジナイズした。この混合液に750 μ lのSDS (10%)、125 μ lのproteinase K (20 mg/ml)を加え、軽く混和し、50℃で8時間放置した。その後、フェノール・クロロホルム処理を行い、最後にエタノール沈殿により、ゲノムDNAを精製した。5 μ gの得られたゲノムDNAを制限酵素EcoRI (NEB社製)で完全に消化し、N-mycのプロンプを用いてサザンハイブリダイゼーションによりN-myc増幅を調べた。

3. 予後良好な神経芽細胞腫の臨床組織からmRNAの調製

上記2において予後良好であると判定された神経芽細胞腫の臨床組織サンプル2~3 gをTotal RNA Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて処理し、トータルRNAを抽出した。抽出したトータルRNAを、オリゴdTセルロースカラム (Collaborative社製)を用いて、polyA構造を有するmRNAのプールを精製した。

4. mRNAの脱リン酸化

上記3において調製した100~200 μ gのmRNAのプールを67.3 μ lの0.1%ジエチルピロカーボネート (DEPC)を含む蒸留滅菌水に溶解させ、20 μ lの5x BAPバッファ [Tris-HCl (500 mM, pH=7.0) / メルカプトエタノール (50 mM)]、2.7 μ lのRNasin (40 unit / μ l: Promega社製)、10 μ lのBAP (0.25 unit / μ l、バクテリア由来アルカリフォスファターゼ: 宝酒造社製)を加えた。この混合液を37℃で1時

間反応させ、mRNAの5'末端の脱リン酸化処理を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理を2回行い、最後にエタノール沈殿により、脱リン酸化mRNAのプールを精製した。

5. 脱リン酸化mRNAの脱キャップ処理

5 上記4において調製した脱リン酸化mRNAのプールの全量を75.3 μ lの0.1%DEPCを含む蒸留滅菌水に溶解させ、20 μ lの5xTAPバッファー [酢酸ナトリウム (250 mM、pH=5.5) /メルカプトエタノール (50 mM)、EDTA (5 mM、pH=8.0)]、2.7 μ lのRNasin (40 unit/ μ l)、2 μ lのTAP (Tobacco Acid pyrophosphatase: 20 unit/ μ l)]を加えた。この混合液を37°Cで1時間反応させ、脱リン酸化mRNAの5'末端の脱キャップ処理を行った。この際、キャップ構造を持たない不完全長の脱リン酸化mRNAは脱キャップ処理されず5'末端は脱リン酸化された状態に留まった。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿により、脱キャップmRNAのプールを精製した。

6. オリゴキャップmRNAの調製

20 上記5において調製した脱キャップmRNAのプールの全量を11 μ lの0.1%DEPCを含む蒸留滅菌水に溶解させ、4 μ lの5'-オリゴRNA (5'-AGCAUCGAGUCGGCCUUGGCCUACU GG-3': 100 ng/ μ l)、10 μ lの10xligationバッファー [Tris-HCl (500 mM、pH=7.0) /メルカプトエタノール (100 mM)]、10 μ lの塩化マグネシウム (50 mM)、2.5 μ lのATP (24 mM)、2.5 μ lのRNasin (40 unit/ μ l)、10 μ lのT4 RNA ligase (25 unit/ μ l:宝酒造社製)、50 μ lのポリエチレングリコール (50% w/v、

PEG 8000 : シグマ社製) を加えた。この混合液を 20℃で 3 時間
反応させ、脱キャップ mRNA の 5' 末端に 5' - オリゴ RNA を連結し
た。この際、キャップ構造を持たない不完全長の脱リン酸化 mRNA は、
5' - オリゴ RNA が連結されない。その後、フェノール・クロロホルム
5 処理、エタノール沈殿により、オリゴキャップ mRNA のプールを精製
した。

7. オリゴキャップ mRNA からの DNA 除去

上記 6 において調製したオリゴキャップ mRNA のプールを 70.3
μl の 0.1% DEPC を含む蒸留滅菌水に溶解させ、4 μl の Tris-HCl (1M、pH=7.0)、5.0 μl の DTT (0.1M)、
10 16 μl の塩化マグネシウム (50 mM)、2.7 μl の RNasin (40 unit/μl)、2 μl の DNase I (5 unit/μl : 宝酒造
社製) を加えた。この混合液を 37℃で 10 分間反応させ、余分な DN
A を分解した。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈
15 殿、カラム精製 (S-400 HR : ファルマシアバイオテック社製) に
より、DNA (-) オリゴキャップ mRNA のプールを精製した。

8. 1st strand cDNA の調製

上記 7 において調製した DNA (-) オリゴキャップ mRNA のプー
ルを Super Script II (ライフテックオリエンタル社製
20 キット) を用いて逆転写し、1st strand cDNA のプール
を得た。DNA (-) オリゴキャップ mRNA のプールを 21 μl の滅
菌蒸留水に溶解させ、10 μl の 10x First Strandバッ
ファー (キット付属品)、8 μl の dNTP mix (5 mM、キット付属
品)、6 μl の DTT (0.1M、キット付属品)、2.5 μl のオリゴ
25 -dT アダプタープライマー (5 pmol/μl、5'-GCGGCTG
AAGACGGCCTATGTGGCCTTTTTTTTTTTT

TTT-3'), 2.0 μ l の RNasin (40 unit/ μ l)、2 μ l の Super Script II RTase (キット付属品) を加えた。この混合液を 42°C で 3 時間反応させ、逆転写反応を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理、アルカリ処理、中和処理にて
5 全ての RNA を分解し、エタノール沈殿で精製した。

9. 2nd strand cDNA の調製

上記 8 において調製した 1st strand cDNA のプールを Gene Amp (パーキンエルマー社製キット) を用いて、PCR 増幅を行った。1st strand cDNA のプールを 52.4 μ l
10 の滅菌蒸留水に溶解させ、30 μ l の 3.3x Reaction バッファ (キット付属品)、8 μ l の dNTP mix (2.5 mM、キット付属品)、4.4 μ l の酢酸マグネシウム (25 mM、キット付属品)、1.6 μ l のプライマー F (10 pmol/ μ l、5'-AGCATCGAGTCGGCCTTGTTG-3')、1.6 μ l のプライマー R (10 pmol/ μ l、5'-GCGCTGAAGACGGCCTATGT-3')、2 μ l の rTth (キット付属品) を加えた。この混合液に、100 μ l のミネラルオイルを静かに加え重層した。この反応液を 94°C で 5 分間変性させた後、94°C、1 分間、52°C、1 分間、72°C、10 分間を 1 サイクルとして 12 サイクル繰り返し、さらに 72°C で 10
15 分間放置し PCR 反応を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿で精製し、2nd strand cDNA のプールを得た。

10. 2nd strand cDNA の Sfi I 処理

上記 9 において調製した 2nd strand cDNA のプールを
25 87 μ l の滅菌蒸留水に溶解させ、10x NEB バッファ (NEB 社製)、100x BSA (ウシ血清アルブミン、NEB 社製)、2 μ l の S

f i I (制限酵素、20 unit/μl、NEB社製)を加えた。この混合液を50℃で一晩反応させ、S f i Iによる制限酵素処理を行った。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿で精製し、両末端がS f i I処理されたcDNAのプールを得た。

5 11. S f i I処理されたcDNAのサイズ分画

上記10において調製したS f i I処理されたcDNAのプールを1%のアガロースゲルで電気泳動し、2 kb以上の分画をG e n e c l e a n I I (B i o 101社製)を用いて精製した。精製したcDNAのプールは100 μlの滅菌蒸留水に溶解させ、37℃で6時間
10 放置した。その後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿で精製し、長鎖cDNAのプールを得た。

12. cDNAライブラリー

上記11において調製した長鎖cDNAのプールをDNA L i g a t i o n k i t v e r . 1 (宝酒造社製キット)を用いてクローニングベクターであるpME18S-FL3 (東京大学医科学研究所 菅野純夫教授より供与)にライゲーションを行った。長鎖cDNAのプールを8 μlの滅菌蒸留水に溶解させ、あらかじめ制限酵素D r a I I I
15 で処理された1 μlのpME18S-FL3、80 μlのS o l u t i o n A (キット付属品)、10 μlのS o l u t i o n B (キット付属品)を加え、16℃で3時間反応させた。その後、フェノール・クロ
20 ロホルム処理、エタノール沈殿で精製しcDNAライブラリーを得た。

(実施例1) 大腸菌へのトランスフォーメーション

1. クローニング

実施例1の12で調製したcDNAライブラリーを大腸菌(TOP-
25 10、Invitrogen社製)にトランスフォーメーションした。
cDNAライブラリーを10 μlの滅菌蒸留水に溶解し、TOP-10

に混合した。その後、氷上にて30分間、40℃で1分間、氷上で5分間インキュベートした。500 μ lのSOB培地を加え、37℃で60分間振盪培養した。アンピシリンを含む寒天培地上に適量つつ播種し、37℃で一昼夜培養して、大腸菌クローンを得た。

5 2. 大腸菌クローンの保存（グリセロールストックの調製）

上記1において得られた寒天培地上の大腸菌クローンを、爪楊枝にて拾い上げ、96穴プレートに準備した120 μ lのLB培地中に懸濁させた。この96穴プレートを37℃で一晩静置し、大腸菌の培養を行った。その後、60%グリセロール溶液を72 μ l加え、-20℃で保存した（グリセロールストック）。

10

（実施例2）塩基配列決定

1. プラスミドの調製

実施例1の2で調製した10 μ lのグリセロールストックを15mlの遠心チューブに移し、3mlのLB培地、50 μ g/mlのアンピシリンを加え、37℃で一晩振盪し、大腸菌の培養を行った。その後、QIAprep Spin Miniprep Kit（QIAGEN社製）を用いて大腸菌からプラスミドDNAを抽出、精製した。

15

2. 両末端シーケンスの解析

上記1において調製したプラスミドDNAをDNA Sequencing Kit（ABI社製キット）を用いて両末端のシーケンスを決定した。600ngのプラスミドDNA、8 μ lのプレミックス（キット付属品）、3.2pmolのプライマーを混合し、滅菌蒸留水で合計20 μ lになるように調製した。この混合液を96℃2分間変性させた後、96℃、10秒間、50℃、5秒間、60℃、4分間を1サイクルとして25サイクル繰り返し反応を行った。その後エタノール沈殿で精製した。変性条件下でポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、A

20

25

BI377 (ABI社製) を用いて配列決定を行った。

(実施例3) データベースを用いたホモロジー検索

実施例2において両末端シーケンスを解析して得られたサンプルの塩基配列情報についてインターネットを介したDNA配列のホモロジー
5 検索を行った。検索にはNCBI(National Center of Biotechnology Information USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) のBLASTを用いた。ホモロジー検索の結果、cDNAサンプルの一つであるnb1a0078はヒト9番染色体上のゲノムシーケンス(GenBank 受理番号AL161625) と高い相同性を示した。
10

(実施例4) nb1a0078の全長クローニング

実施例3で得られたゲノム配列について、遺伝子転写配列をGENE
SCAN(Burge C等: 1997、1998) およびFGENESH(Salamov AA等: 1999) を用いて予測した。予測された配列をもとにnb1a0078の全長を以下の方法でクローニング
15

すなわち、予後良好な神経芽細胞腫臨床組織サンプルから抽出した15 μ gのトータルRNAをSuperscript II reverse transcriptase (GIBCO社製) を用いてcDNAに逆転写した。逆転写した2 μ lのcDNAに5 μ lの滅菌蒸留水、
20 1 μ lの10x rTaqバッファー(宝酒造社製)、1 μ lの2mM dNTPs、各々0.5 μ lの合成プライマーセット、0.5 μ lのrTaq(宝酒造社製) を混合した。この混合液を95 $^{\circ}$ Cで2分間変性させた後、95 $^{\circ}$ C、15秒間、58 $^{\circ}$ C、15秒間、72 $^{\circ}$ C、20秒間を1サイクルとして35サイクル繰り返し、さらに72 $^{\circ}$ Cで20分間放置しP
25

CR反応を行った。PCRで増幅したバンドをpGEM-T easy vector (Promega社製) にサブクローニングし、一般的手法 (Sanger F. 等: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467. (1977)) を用いて塩基配列を決定した。解析にはABI 377 (ABI社製) を用いた。塩基配列は全

5 て両鎖とも解析した。

得られたNEDL-1遺伝子配列をDDBJ、GenBank、EMBLに登録した。受理番号はAB048365である。

(実施例5) 半定量的RT-PCRによる予後良好・不良神経芽細胞腫

10 でのNEDL-1遺伝子発現の比較

全ての半定量的RT-PCRは以下の方法により実施した。

1. 逆転写 (RT) 反応

抽出した5 μ gのトータルRNAをSuperscript II reverse transcriptase (GIBCO社製) を用

15 いてcDNAに逆転写した。

2. PCR反応

PCR反応はrTaq (宝酒造社製) を用いて行った。逆転写した2 μ lのcDNA、5 μ lの滅菌蒸留水、1 μ lの10x rTaqバッファ、1 μ lの2mM dNTPs、各々0.5 μ lの合成プライマー

20 セット、0.5 μ lのrTaqを混合した。この混合液を95°Cで2分間変性させた後、95°C、15秒間、58°C、15秒間、72°C、20秒間を1サイクルとして35サイクル繰り返し、さらに72°Cで20分間放置しPCR反応を行った。

また陽性対照としてGAPDHを用いた。プライマーを以下に示す

25 FW: 5' CTGCACCAACAATATCCC 3' (配列番号3)

RV: 5' GTAGAGACAGGGTTTCAC 3' (配列番号4)

3. N E D L - 1 遺伝子発現の比較

製造例 1 の 3 で得られた予後良好・不良神経芽細胞腫のトータル R N A について、上記の条件で R T - P C R 反応を行った。この反応液を 2 . 5 % のアガロースゲルで電気泳動した。この結果、N E D L - 1 遺伝子
5 の発現が予後良好な神経芽細胞腫臨床組織に特異的であることが確認された。結果を図 2 に示す。なお、図 2 中、各レーンのサンプルは以下のとおりである。

レーン F 1 ~ 1 6 (左側): 予後良好な神経芽細胞腫臨床組織サンプル

レーン U F 1 ~ 1 6 (右側): 予後不良な神経芽細胞腫臨床組織サンプ
10 ル

対照: G A P D H

陽性対照 (予後良好): T r k A

陰性対照 (予後不良): N M Y C

(実施例 6) 半定量的 P C R による組織依存的 N E D L - 1 遺伝子発
15 現

ヒト正常組織の m R N A (C l o n t e c h 社製) を用いて実施例 5 に示した条件で R T - P C R 反応を行った。この反応液を 2 . 5 % のアガロースゲルで電気泳動した。この結果、N E D L - 1 遺伝子発現の分布はヒト正常組織において組織特異性があることが確認された。結果を
20 図 3 A に示す。対照として G A P D H を使用した。N E D L - 1 の発現は、脳、胎児脳、小脳、および腎臓に局限されていた。

(実施例 7) 半定量的 P C R による神経芽腫細胞株依存的 N E D L - 1 遺伝子発現

種々の神経芽腫細胞株からのトータル R N A について、実施例 5 に示した条件で R T - P C R 反応を行った。この反応液を 2 . 5 % のアガロースゲルで電気泳動した。この結果、N E D L - 1 遺伝子発現の分布は
25

細胞特異性があることが確認された。結果を図3Bに示す。NEDL-1の発現が見られたのは、SKN-DZ、TGW、KAN、KCN+8、およびLAN-5であった。

(実施例8) ノザンハイブリダイゼーション

5 ヒト各組織のポリ(A)⁺RNAをプロットした multiple tissue Northern blot を用いて、NEDL-1 cDNA (³²Pで標識) をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。対照としてβアクチン cDNA プローブを用いた。結果を図4に示す。脳、腎臓、および胎児脳に約10.0および7.0 kbの2つの転写産物が観察された。

10 (実施例9) ユビキチンリガーゼ活性

 E2 (Ub cH5 cまたはUb cH7) を発現するバクテリア細胞溶解物の等量をユビキチン、酵母E1、さらにE3 (Nedd4、NEDL-1、またはNEDL2) と37℃で2時間、インキュベートした。続いて、SDS-PAGEで還元化条件下、分離して、抗ユビキチン抗体でプロットした。E3 (ユビキチンリガーゼ) として、精製組換えGST-Nedd1、GST-NEDL-1/HECT、およびGST-NEDL2/HECTをそれぞれ使用した。結果を図5に示す。ユビキチン化は、E3の量に依存して増加した(図中、点線で囲まれた部分)。NEDL-1は、陽性対照であるNedd4と同程度のユビキチンリガーゼ活性を示した。

15

20

(実施例10) NEDL-1の細胞内局在

 NEDL-1遺伝子の全長をCos7細胞に一過的にトランスフェクトした。48時間後、その細胞を溶解させて、6%ポリアクリルアミド上でSDS-PAGEにかけ、NEDL-1抗体を用いて分析した。各遺伝子産物が約220 kDの位置に検出された。結果を図6Aに示す。

25

 また、内因性発現(CHP134細胞)でも外因性発現(Cos7細胞)

でも N E D L - 1 は、細胞質および細胞膜に主に局在しており、この結果は N e d d 4 ファミリーの他のものともよく一致する (図 6 B)。

(実施例 1 1) N E D L - 1 と A I C D との相互作用

5 N E D L - 1 W W ドメイン領域を D N A 結合ドメイン融合タンパク質として、MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid SYSTEM2 (K 1 6 0 4 - 1: クロ
ンテックカンパニー) を用いて、定型的な yeast two-hybrid screen を
実施した。具体的には、D N A 結合ドメイン Cloning vector である p A
S 2 - 1 (GenBank ACCESSION:U30497) にインフレームで P C R クローニ
10 グし、D N A シークエンサーABI PRISM 377 (Perkin Elmer/B A P P
lied Biosystems) で配列確認を行った。支持酵母細胞株として C G - 1
9 4 5 株を用い、ライブラリーは Human Fetal Brain MATCHMAKER cDNA
Library (Priming Method:Xho I-(dT)15/Vector:pACT2/Cat.#HL4028AH)
を使用した。S D (-His,-Trp) T P D プレートで増殖能の検定を行い、H
I S 3 の阻害剤である 3 - アミノ - 1 , 2 , 4 - トリアゾール 2 0 m M
15 を添加した Y P D 培地でライブラリースクリーニングを行った。H I S +
のコロニーをピックアップし、更に β - ガラクトシダーゼ活性を定法に
より検定し、陽性クローンを選択した。これらの陽性クローンから定法
によりプラスミド D N A を回収した。上述の手順に従い、yeast
two-hybrid screen を実行することで複数個見いだされた陽性クローン
20 中に A I C D 領域を有するクローンが見いだされ、まず当該クローンに
注目してさらに検討を進めた。

当該クローンの A I C D 領域に E P I T O P E として F L A G 配列
(D Y K D D D K) を付加し、C M V プロモーターで発現する哺乳類
細胞発現ベクターを構築し、上述のシーケンサーで配列確認後、C M
25 V - N E D L - 1 発現プラスミドと共に細胞内に一過性に共発現させる
ことで、細胞内での物理的な相互作用が再現できるかどうかの検討を行

った。

Cos7細胞を80% confluentになるよう10% FBSを含むDulbecco's modified Eagle's mediumに維持し、Lipofect
ion法を用いて一過性に各6 μ gのDNAを用いて遺伝子導入を行
5 った。リポソーム試薬としてはLipofectAMINE plus (Life
Technologies, Inc.)を使用した。48時間後、細胞を氷上にてPBSで
2回洗浄し1ml TNE Buffer (10mM Tris-HCl、pH 7.8 / 1% NP40 / 0.15M NaCl / 1mM EDTA / 1
0 μ l aprotinin)を加え、10分間氷上でインキュベートし
10 た。その後Eppendorf tubeに移しProtein B-Sepharose (50% sl
urry)を20 μ l添加し、30分4°Cで回転し、非特異的結合を排
除した。その後15000 rpm / 30分、4°Cで遠心し上清をデカン
テーションで新しいEppendorf tubeに移し、Protein B-Sepharose 35
 μ lと抗NED1抗体を10 μ l添加し4°Cで回転を3時間行った。そ
15 の後、軽くspin downし、TNE Bufferで4回洗浄した
後、TNE buffer 25 μ lおよびx2 sample buffer 25 μ l加え、5分間
 boilし、泳動サンプルとした。同一蛋白量を
15%アクリルアミドゲル、Tricine SDS-PAGEで展開し、PVD F膜に
転写後、3% BSAでブロッキングし、1次抗体を抗FLAG-M2抗
20 体(Sigma)、2次抗体をHRPで標識したAnti-Mouse IgG抗体で抗
体反応後、ECL Western Blotting Detection Reagent (コード番号
RPN2106)で検出した。

図7は、抗NEDL-1抗体で免疫沈降し、抗FLAG抗体で検出し
たものである。レーン2、3と6、7はセット、レーン4、5と8、9
25 はセットであり、それぞれ異なる独立した2個のクローンでの結果であ
る。FLAG-AICDがNEDL-1と共沈している(レーン2、3)。

単純WESTERN BLOTTINGでFLAG-AICDの蛋白発現バンドは弱く、蛋白の不安定性に起因する(レーン4、5)。レーン4、5/8、9はネガティブコントロールであり、単純WESTERN BLOTTINGでは強い発現がみられるにもかかわらず(レーン8、9)、NEDL-1とは共沈していない(レーン4、5)。図8は、抗FLAG抗体で免疫沈降し、NEDL-1抗体で検出したものである。NEDL-1とFLAG-AICDが共存した場合のみ、強い共沈バンドが得られ(レーン4、5)両者の直接的相互作用がわかる。

(実施例12) NEDL-1によるBAPPおよびAICDのユビキチン化

実施例11に記載した、yeast two-hybrid screen を実施したが、ハーベスト前にプロテアソームインヒビターMG132、20 μ Mで2時間処理を行った。その他の実験方法は、ほぼ実施例11に準じた。免疫沈降の結果を図9および図10に示す。

図9Aは、抗HA抗体で免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体でプロットしたものである。NEDL-1の存在下、ユビキチン化された細胞内分子の絶対量が増加していることが分かる。図10は、抗FLAG抗体で免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体でプロットしたものである。図9Bは、抗HA抗体で免疫沈降させ、AICDを認識する抗体でプロットしたものである。 β APPを起点として、上方に高分子のスミアバンドが見られ、 β APPのユビキチン化が示唆される。図9Aと図9BからNEDL-1の存在下、 β APPはユビキチン化を受けることは明らかであるが、その程度は β APPの変異(WTとMT)とは無関係である(図9Aと図9Bのレーン1および2さらにレーン3および4を参照)。AICDのユビキチン化が図9Aのレーン5、6と図10のレーン7、8に示されている。FLAG-AICDは、約7KDの分子量である(図9B)。

図9Aと図10においては、検出に抗ユビキチン抗体を使用しているの
で、ユビキチン化されていないFLAG-AICDは、現れないが（最
下段）、FLAG-AICDに約9KDのユビキチン分子が付加するに従
い、約9KDずつ増加したバンドが抗ユビキチン抗体で検出され（図中
5 の星印）、AICDのみでも、NEDL-1によってユビキチン化を受け
ることが分かる。図中、2本線様に見えるバンドは外来性のHAタグが
付加されたユビキチンと内在性のタグ無しのユビキチンの分子量差を表
している。

（実施例13） NEDL-1とSOD1変異体との相互作用

10 実施例11に記載した、yeast two-hybrid screen をSOD1遺伝子
で実施した。実験方法は、ほぼ実施例11に準じた。すなわち、SOD
1遺伝子（野生型、変異型）をCMV-NEDL-1と細胞内で一過性
に共発現させた。抗NEDL-1抗体で免疫沈降後、洗浄し、泳動サン
プル化した。同一蛋白量を15%SDS-PAGEで展開し、PVD F
15 膜に転写し、抗FLAG抗体で抗体反応後、ECLを用いて検出した。
その結果を図11に示す。同様に、抗FLAG抗体で免疫沈降後、洗浄
し、泳動サンプル化した。同一蛋白量を6%SDS-PAGEで展開し、PVD F
膜に転写し、抗NEDL-1抗体で抗体反応後、ECLを用いて検出し
た。その結果を図12に示す。レーン3において、NEDL-1とSO
20 D1（WT）とは互いに共沈していない。レーン4、5において、発症
後急速な臨床経過を辿り、1年以内に死亡する変異であるSOD1（A
4V）、SOD1（C6F）はNEDL-1と強く相互作用して、共沈し
ている。レーン6において、発症後緩徐な臨床経過を示し、約40年近
く生存可能なSOD1（H46R）はNEDL-1とごく微弱な相互作用
25 しか示さない。レーン7において、発症後特異な神経症状を示す変異
であるSOD1（G93A）は、NEDL-1と中等度の相互作用を示

す。

図 1 1 および図 1 2 に示した試験結果から、N E D L - 1 は、野生型の S O D 1 とは相互作用しないが、家族性 A L S の原因となる S O D 1 変異体とは相互作用することが明らかとなった。さらに、その相互作用の程度と臨床上的悪性度の程度はほぼ相関することも分かった。

(実施例 1 4) N E D L - 1 による S O D 1 変異体のユビキチン化

実施例 1 1 に記載した、yeast two-hybrid screen を実施したが、ハーベスト前にプロテアソームインヒビター M G 1 3 2、2 0 μ M で 2 時間処理を行った。その他の実験方法は、ほぼ実施例 1 1 に準じた。免疫沈降の結果を図 1 3 に示す。ここで、産物を F L A G で免疫沈降させ、抗ユビキチン抗体でプロットしたものである。N E D L - 1 の非存在下でも S O D 1 変異体は、ユビキチン化されている。図 1 3 のレーン 1、3、5、および 7 を参照。ユビキチン化の程度は $3 > 5 > 7 > 1$ であり、変異体の臨床上的重症度（上記で説明）と相関関係がある。これは細胞内に存在する品質管理を司るユビキチンリガーゼ、例えば D o r f i n 等で処理されている可能性がある (Niwa J., Ishigaki S., Doyu M., Suzuki T., Tanaka K., Sobue G. A., Novel centrosomal ring-finger protein, dorfin, mediates ubiquitin ligase activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001 Mar 2; 281 (3): 706-13)。

一方、N E D - 1 の存在下、ユビキチン化の程度が劇的に増強することが分かる。図 1 3 のレーン 2、4、6、および 8 を参照。ユビキチン化の程度は、ここでも $4 > 6 > 8 > 2$ であり、変異体の臨床上的重症度と相関関係がある。N E D L - 1 は、S O D 1 変異体に対して、変異型 B A P P とは異なり強くユビキチン化能を発揮する品質管理ユビキチンリガーゼとしての機能を有することが分かる。

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明の核酸プローブ或いは本発明のプライマーは、各種ハイブリダイゼーションまたはPCR法に使用でき、NEDL-1遺伝子の神経芽細胞腫のみならず他ヒト組織、細胞での発現の検出や、その構造および機能の解析を可能とする。また、本発明は該遺伝子がコードするNEDL-1タンパク質の遺伝子工学的製造も可能とする。該タンパク質は、ユビキチンリガーゼ活性が確認され、その構造からもHECT型ユビキチンリガーゼであることが明らかとなった。したがって、ユビキチン-プロテアソーム系におけるNEDL-1タンパク質の基質の同定が可能になり、それが関与する神経変性疾患の治療の可能性を開く。実際、NEDL-1が β APP、AICDやSOD1（変異型）と相互作用することが確かめられた。さらに、これらの相互作用がユビキチン化を介していることも確かめられた。

また、本発明に係る核酸は、予後良好な神経芽細胞腫で発現が増強されているNEDL-1遺伝子に由来する核酸であり、従って、これらの核酸に基づく遺伝子情報により神経芽細胞腫の予後の診断が可能となる。該遺伝子は、N-myc遺伝子が予後不良因子であるのに対して、TrkA遺伝子と同様に予後良好因子と見なされるので、神経芽細胞腫の悪性度および抗癌剤に対しての感受性の指標(腫瘍マーカー)となり得る。具体的には、本発明の核酸プローブ或いは本発明のプライマーを用いて、神経芽細胞腫の予後診断剤または診断用キットを構成し、臨床組織サンプルからNEDL-1遺伝子若しくはNEDL-1タンパク質を検定し、予後の診断を行いうる。

請求の範囲

1. 以下の(a)または(b)の核酸を含む核酸プローブ：
 - (a)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸；
 - 5 (b)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸。
2. 前記核酸がDNAであることを特徴とする請求項 1 に記載の核酸プローブ。
- 10 3. 核酸が少なくとも 20 個の塩基長である請求項 1 または 2 に記載の核酸プローブ。
4. 前記配列表の配列番号 2 に示す塩基配列がその全長である請求項 3 に記載の核酸プローブ。
5. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の核酸プローブを有効成分とする神経芽細胞腫の予後診断剤。
- 15 6. 以下の(a)または(b)のDNAを含むプライマー：
 - (a)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有するDNA；
 - (b)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA、またはそれと相補的な塩基配列を有するDNA。
- 20 7. 請求項 6 に記載のプライマーを有効成分とする神経芽細胞腫の予後診断用キット。
8. 神経芽細胞腫の臨床組織サンプルから配列表の配列番号 2 に示す塩基配列からなる核酸の有無を検出することを特徴とする、神経芽細胞腫の予後の診断方法。
- 25

9. 神経芽細胞腫の臨床組織サンプルから配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の有無を検出することを特徴とする、神経芽細胞腫の予後の診断方法。

5 10. (a)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列の一部、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸、または(b)配列表の配列番号 2 に示す塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸、またはそれと相補的な塩基配列を有する核酸を神経芽細胞腫の臨床組織サンプルと接触させて、配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質の発現およびその量を分析することを特徴とする、
10 神経芽細胞腫の予後の診断方法。

11. 配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を有効成分として含むポリユビキチン化剤。

12. ユビキチン化される基質がアミロイド β 前駆蛋白(β APP)であることを特徴とする請求項 11 に記載のポリユビキチン化剤。

15 13. ユビキチン化される基質がアミロイド β 前駆蛋白細胞内領域(AICD)であることを特徴とする請求項 11 に記載のポリユビキチン化剤。

20 14. ユビキチン化される基質がスーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)変異体であることを特徴とする請求項 11 に記載のポリユビキチン化剤。

15. アミロイド β 前駆蛋白(β APP)の調節用組成物であって、配列表の配列番号 1 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をアミロイド β 前駆蛋白の細胞内での発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物。

25 16. アミロイド β 前駆蛋白(β APP)の調節用組成物であって、配列表の配列番号 2 に示す塩基配列を有する核酸をアミロイド β 前駆蛋白

白の細胞内での発現、産生、または形成を調節するのに有効な量含むことを特徴とする調節用組成物。

5 17. 細胞に配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をアミロイド β 前駆蛋白(β APP)の細胞内発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内でのアミロイド β 前駆蛋白の発現、産生、または形成を調節する方法。

10 18. 細胞に配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をアミロイド β 前駆蛋白の細胞内発現、産生、または形成を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内でのアミロイド β 前駆蛋白(β APP)の発現、産生、または形成を調節する方法。

19. スーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性の調節用組成物であって、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をスーパーオキシドジムスターゼ活性を細胞内で調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物。

15 20. スーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性の調節用組成物であって、配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をスーパーオキシドジムスターゼ活性を細胞内で調節するのに有効な量、含むことを特徴とする調節用組成物。

20 21. スーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)が変異型であることを特徴とする、請求項19または20に記載の調節用組成物。

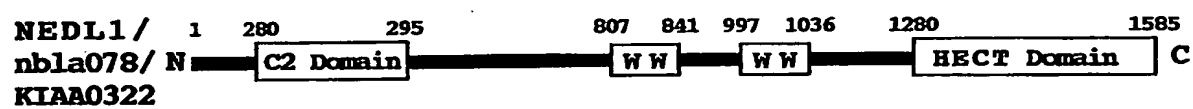
22. 細胞に配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質をスーパーオキシドジムスターゼ(SOD1)活性を調節するのに有効な量、投与することからなる細胞内におけるスーパーオキシドジムスターゼ活性を調節する方法。

25 23. 細胞に配列表の配列番号2に示す塩基配列を有する核酸をスーパーオキシドジムスターゼ活性(SOD1)を調節するのに有効な量、

投与することからなる細胞内におけるスーパーオキシドジムスターゼ活性を調節する方法。

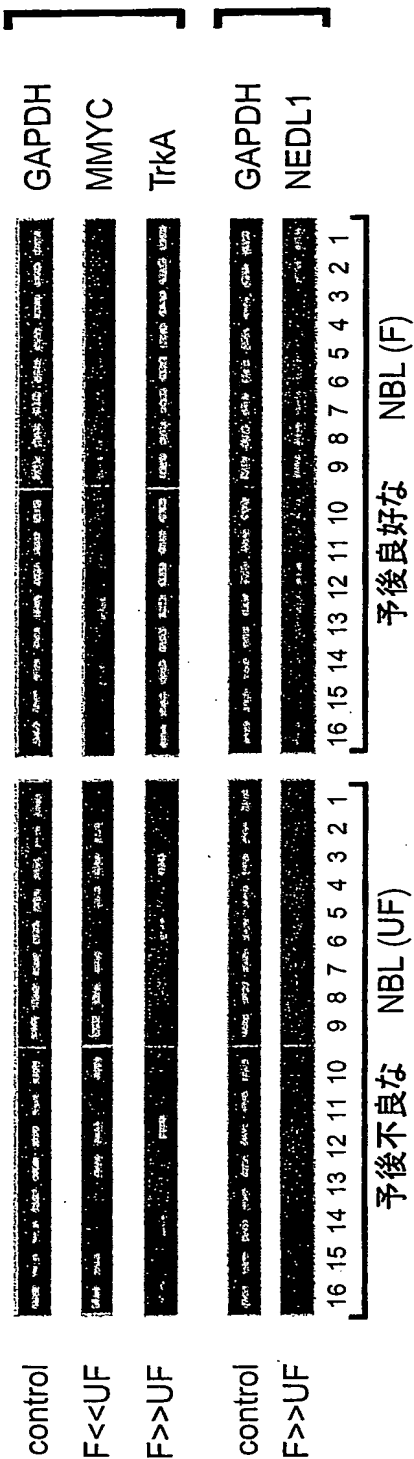
24. スーパーオキシドジムスターゼ (SOD1) が変異型であることを特徴とする、請求項22または23に記載の方法。

図 1A



[illegible]

図2



3A

	GAPDH	NEDL1
1		brain
2		liver
3		heart
4		kidney
5		lung
6		trachea
7		colon
8		small intestine
9		stomach
10		bone marrow
11		thymus
12		spleen
13		mammary gland
14		testis
15		uterus
16		prostate
17		heart
18		skeletal muscle
19		brain
20		cerebellum
21		fetal brain
22		spinal cord
23		fetal liver
24		placenta
25		adrenal gland
26		pancreas
27		salivary gland
28		liver
29		prostate
30		thyroid

3B

	GAPDH	NEDL1
1		RISA
2		CHP901
3		GAMB
4		GOTO-P3
5		SK-N-AS
6		KAN
7		KCN
8		KCN+8
9		KP-N-NS
10		LAN-5
11		LHN
12		OAN
13		NB-9
14		NB-69
15		NB-KM1
16		NBL5
17		NBTU-1
18		SKN-BE
19		NLF
20		NMB
21		NGP
22		RTSM-1
23		SAN
24		IMR-32
25		NB-1
26		SKN-DZ
27		SK-N-SH
28		TNB
29		TGW
30		A875
31		C201

図4

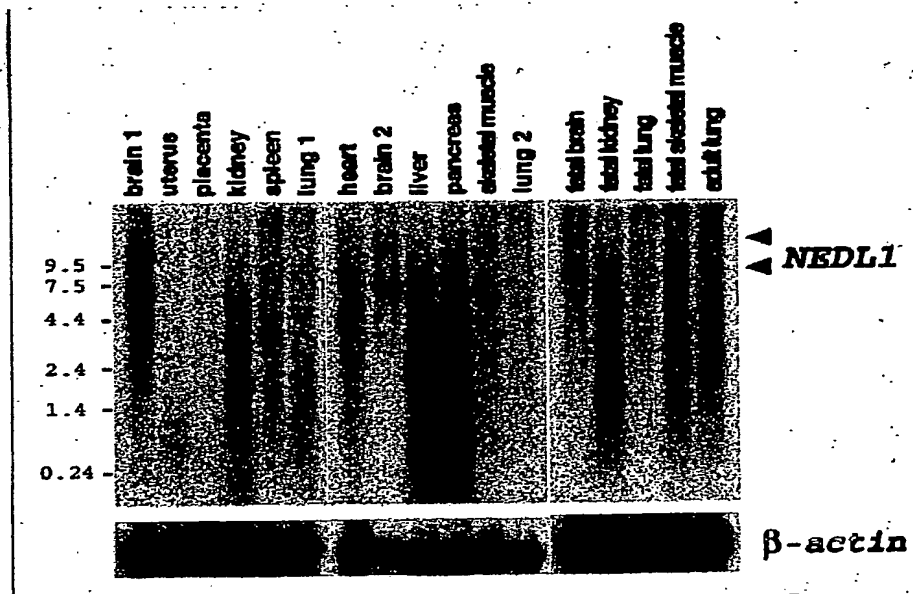


図5

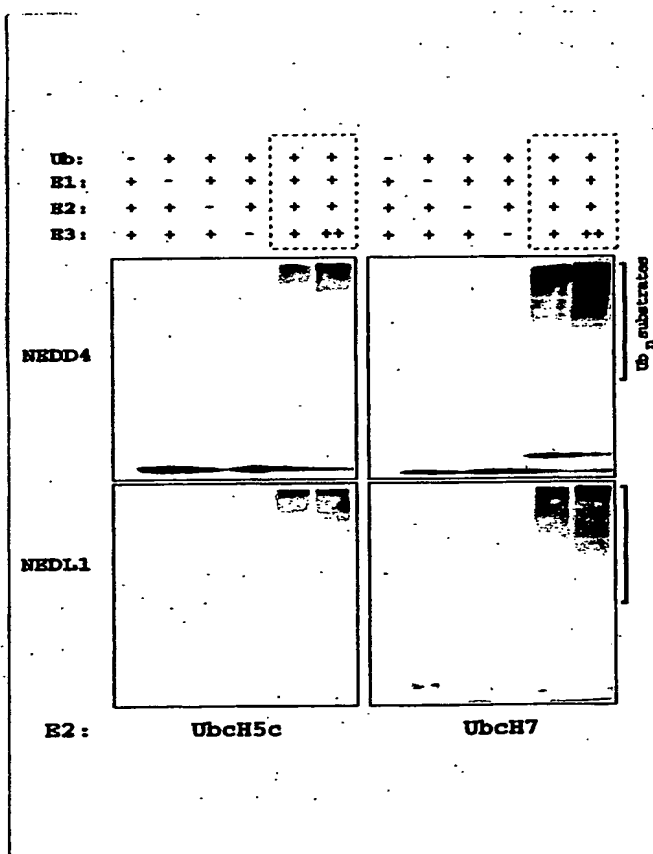


図6A

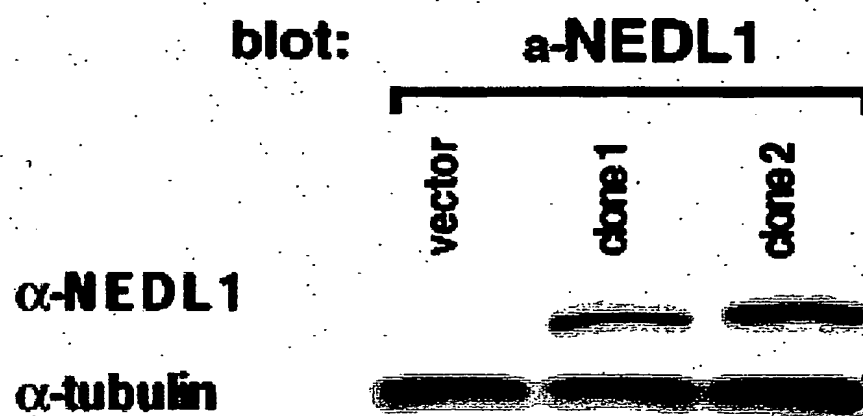
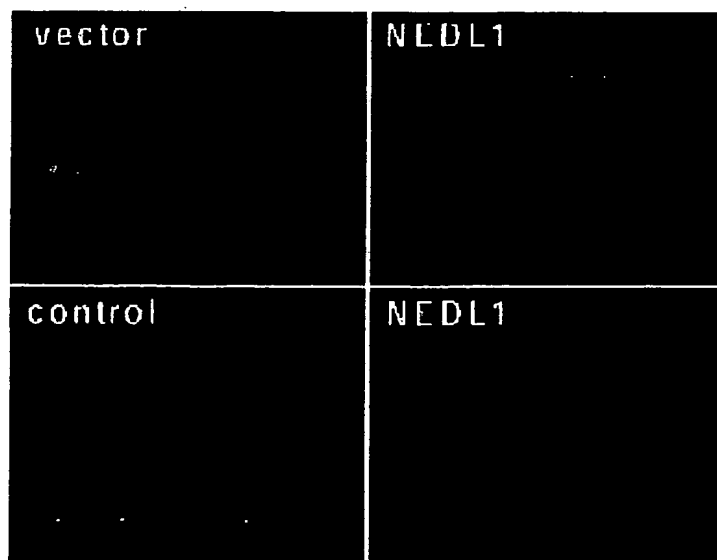
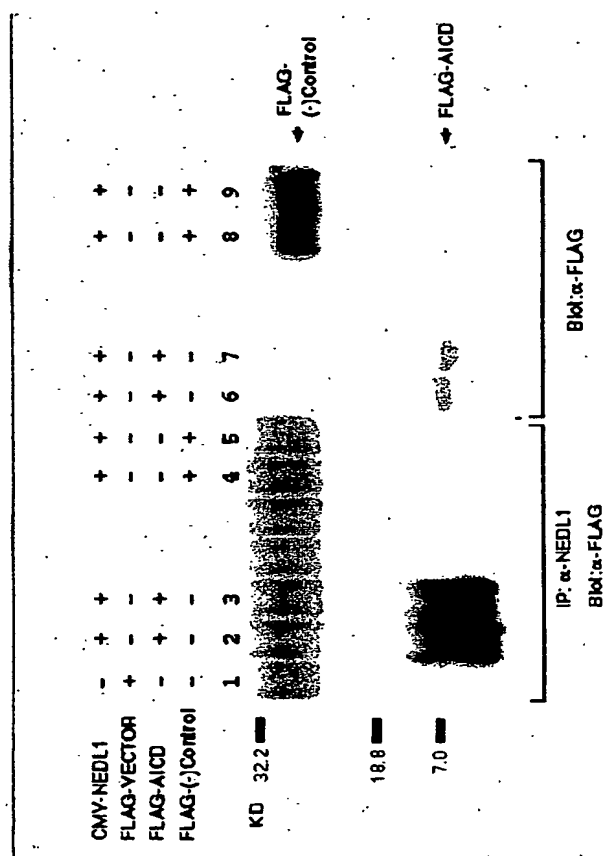


図6B



ノ 凶



8

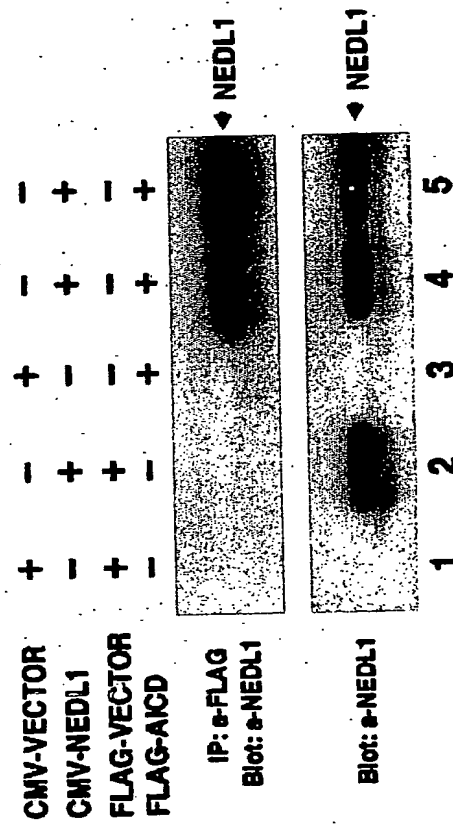


図9A

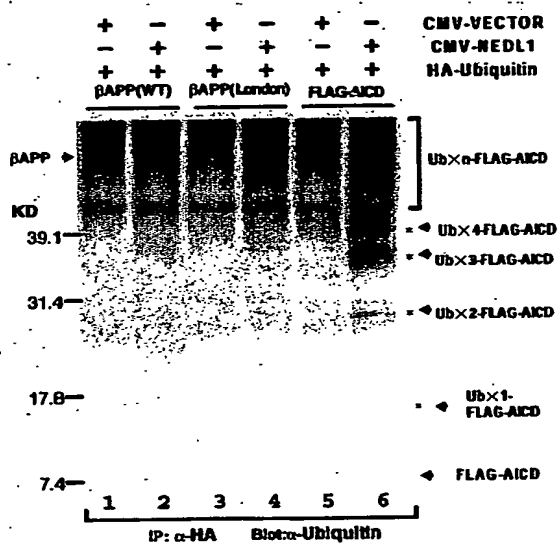


図9B

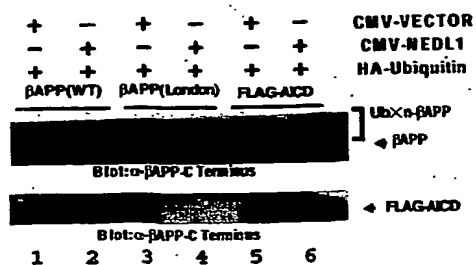
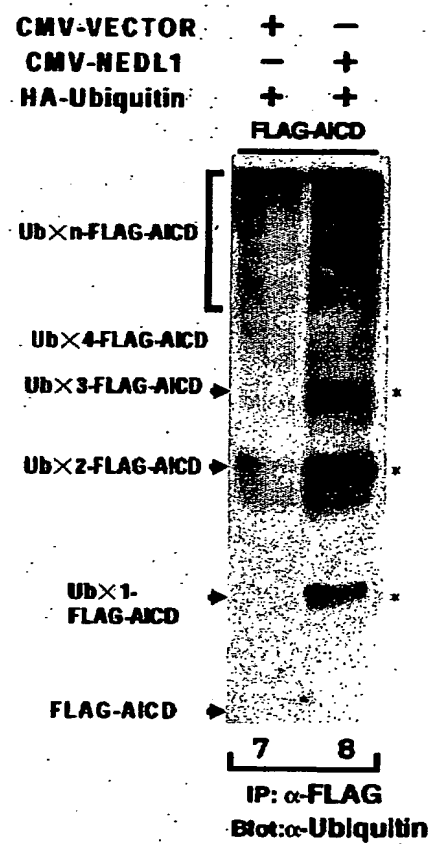
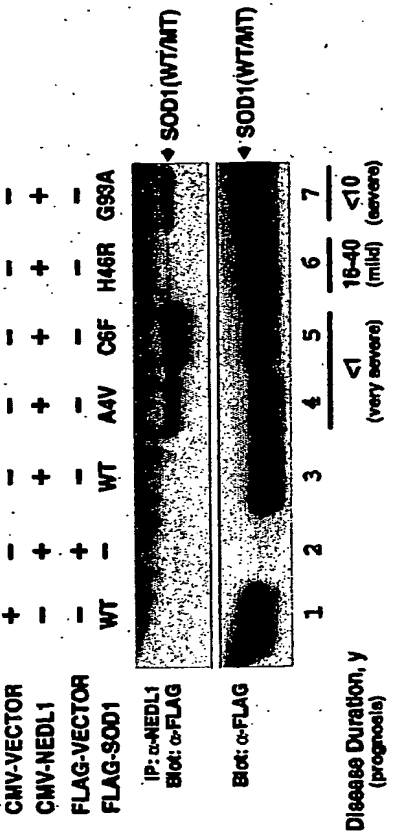


図10



11



12

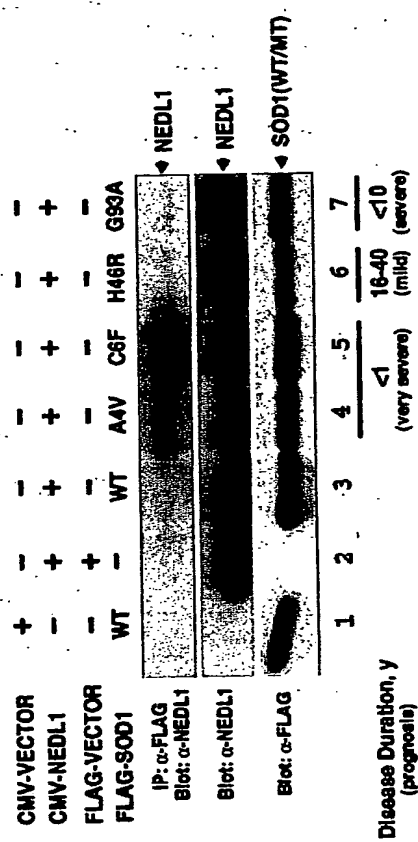
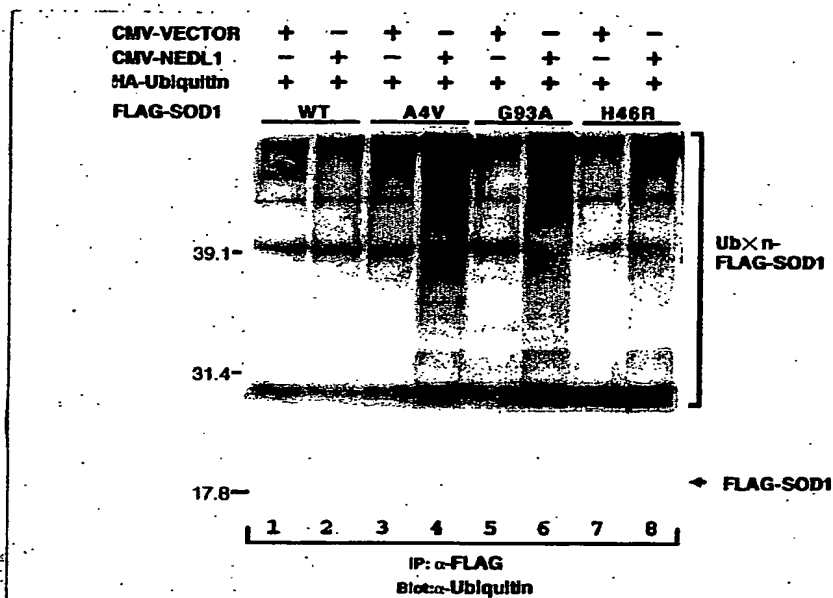


図13



SEQUENCE LISTING

<110> Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.

5 <120> Novel gene NEDL-1

<130> FP02-0209-00WO

<140>

10 <141>

<150> JP 2002-116753

<151> 2002-4-18

15 <150> JP 2001-254974

<151> 2001-8-24

<160> 4

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1585

<212> PRT

25 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

5 <400> 1

Met Ala Ser Pro Ser Arg Asn Ser Gln Ser Arg Arg Arg Cys Lys Glu

1 5 10 15

Pro Leu Arg Tyr Ser Tyr Asn Pro Asp Gln Phe His Asn Met Asp Leu

10 20 25 30

Arg Gly Gly Pro His Asp Gly Val Thr Ile Pro Arg Ser Thr Ser Asp

35 40 45

15 Thr Asp Leu Val Thr Ser Asp Ser Arg Ser Thr Leu Met Val Ser Ser

50 55 60

Ser Tyr Tyr Ser Ile Gly His Ser Gln Asp Leu Val Ile His Trp Asp

65 70 75 80

20

Ile Lys Glu Glu Val Asp Ala Gly Asp Trp Ile Gly Met Tyr Leu Ile

85 90 95

Asp Glu Val Leu Ser Glu Asn Phe Leu Asp Tyr Lys Asn Arg Gly Val

25 100 105 110

	Asn Gly Ser His Arg Gly Gln Ile Ile Trp Lys Ile Asp Ala Ser Ser
	115 120 125
5	Tyr Phe Val Glu Pro Glu Thr Lys Ile Cys Phe Lys Tyr Tyr His Gly
	130 135 140
	Val Ser Gly Ala Leu Arg Ala Thr Thr Pro Ser Val Thr Val Lys Asn
	145 150 155 160
10	Ser Ala Ala Pro Ile Phe Lys Ser Ile Gly Ala Asp Glu Thr Val Gln
	165 170 175
	Gly Gln Gly Ser Arg Arg Leu Ile Ser Phe Ser Leu Ser Asp Phe Gln
	180 185 190
15	Ala Met Gly Leu Lys Lys Gly Met Phe Phe Asn Pro Asp Pro Tyr Leu
	195 200 205
	Lys Ile Ser Ile Gln Pro Gly Lys His Ser Ile Phe Pro Ala Leu Pro
20	210 215 220
	His His Gly Gln Glu Arg Arg Ser Lys Ile Ile Gly Asn Thr Val Asn
	225 230 235 240
25	Pro Ile Trp Gln Ala Glu Gln Phe Ser Phe Val Ser Leu Pro Thr Asp
	245 250 255

Val Leu Glu Ile Glu Val Lys Asp Lys Phe Ala Lys Ser Arg Pro Ile
260 265 270

5 Ile Lys Arg Phe Leu Gly Lys Leu Ser Met Pro Val Gln Arg Leu Leu
275 280 285

Glu Arg His Ala Ile Gly Asp Arg Val Val Ser Tyr Thr Leu Gly Arg
290 295 300

10 Arg Leu Pro Thr Asp His Val Ser Gly Gln Leu Gln Phe Arg Phe Glu
305 310 315 320

Ile Thr Ser Ser Ile His Pro Asp Asp Glu Glu Ile Ser Leu Ser Thr
15 325 330 335

Glu Pro Glu Ser Ala Gln Ile Gln Asp Ser Pro Met Asn Asn Leu Met
340 345 350

20 Glu Ser Gly Ser Gly Glu Pro Arg Ser Glu Ala Pro Glu Ser Ser Glu
355 360 365

Ser Trp Lys Pro Glu Gln Leu Gly Glu Gly Ser Val Pro Asp Arg Pro
370 375 380

25 Gly Asn Gln Ser Ile Glu Leu Ser Arg Pro Ala Glu Glu Ala Ala Val

385 390 395 400
Ile Thr Glu Ala Gly Asp Gln Gly Met Val Ser Val Gly Pro Glu Gly
405 410 415
5
Ala Gly Glu Leu Leu Ala Gln Val Gln Lys Asp Ile Gln Pro Ala Pro
420 425 430
Ser Ala Glu Glu Leu Ala Glu Gln Leu Asp Leu Gly Glu Glu Ala Ser
10 435 440 445
Ala Leu Leu Leu Glu Asp Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Lys Glu Glu
450 455 460
15 Pro Leu Glu Glu Glu Ala Thr Thr Gln Ser Arg Ala Gly Arg Glu Glu
465 470 475 480
Glu Glu Lys Glu Gln Glu Glu Glu Gly Asp Val Ser Thr Leu Glu Gln
485 490 495
20 Gly Glu Gly Arg Leu Gln Leu Arg Ala Ser Val Lys Arg Lys Ser Arg
500 505 510
Pro Cys Ser Leu Pro Val Ser Glu Leu Glu Thr Val Ile Ala Ser Ala
25 515 520 525

	Cys Gly Asp Pro Glu Thr Pro Arg Thr His Tyr Ile Arg Ile His Thr
	530 535 540
5	Leu Leu His Ser Met Pro Ser Ala Gln Gly Gly Ser Ala Ala Glu Glu
	545 550 555 560
	Glu Asp Gly Ala Glu Glu Glu Ser Thr Leu Lys Asp Ser Ser Glu Lys
	565 570 575
10	Asp Gly Leu Ser Glu Val Asp Thr Val Ala Ala Asp Pro Ser Ala Leu
	580 585 590
	Glu Glu Asp Arg Glu Glu Pro Glu Gly Ala Thr Pro Gly Thr Ala His
	595 600 605
15	Pro Gly His Ser Gly Gly His Phe Pro Ser Leu Ala Asn Gly Ala Ala
	610 615 620
	Gln Asp Gly Asp Thr His Pro Ser Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Ser
20	625 630 635 640
	Pro Arg Gln Gly Gly Asp His Ser Cys Glu Gly Cys Asp Ala Ser Cys
	645 650 655
25	Cys Ser Pro Ser Cys Tyr Ser Ser Ser Cys Tyr Ser Thr Ser Cys Tyr
	660 665 670

Ser Ser Ser Cys Tyr Ser Ala Ser Cys Tyr Ser Pro Ser Cys Tyr Asn
675 680 685

5 Gly Asn Arg Phe Ala Ser His Thr Arg Phe Ser Ser Val Asp Ser Ala
690 695 700

Lys Ile Ser Glu Ser Thr Val Phe Ser Ser Gln Asp Asp Glu Glu Glu
705 710 715 720

10 Glu Asn Ser Ala Phe Glu Ser Val Pro Asp Ser Met Gln Ser Pro Glu
725 730 735

Leu Asp Pro Glu Ser Thr Asn Gly Ala Gly Pro Trp Gln Asp Glu Leu
15 740 745 750

Ala Ala Pro Ser Gly His Val Glu Arg Ser Pro Glu Gly Leu Glu Ser
755 760 765

20 Pro Val Ala Gly Pro Ser Asn Arg Arg Glu Gly Glu Cys Pro Ile Leu
770 775 780

His Asn Ser Gln Pro Val Ser Gln Leu Pro Ser Leu Arg Pro Glu His
785 790 795 800

25 His His Tyr Pro Thr Ile Asp Glu Pro Leu Pro Pro Asn Trp Glu Ala

	805	810	815
	Arg Ile Asp Ser His Gly Arg Val Phe Tyr Val Asp His Val Asn Arg		
	820	825	830
5	Thr Thr Thr Trp Gln Arg Pro Thr Ala Ala Ala Thr Pro Asp Gly Met		
	835	840	845
	Arg Arg Ser Gly Ser Ile Gln Gln Met Glu Gln Leu Asn Arg Arg Tyr		
10	850	855	860
	Gln Asn Ile Gln Arg Thr Ile Ala Thr Glu Arg Ser Glu Glu Asp Ser		
	865	870	875 880
15	Gly Ser Gln Ser Cys Glu Gln Ala Pro Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly		
	885	890	895
	Gly Ser Asp Ser Glu Ala Glu Ser Ser Gln Ser Ser Leu Asp Leu Arg		
	900	905	910
20	Arg Glu Gly Ser Leu Ser Pro Val Asn Ser Gln Lys Ile Thr Leu Leu		
	915	920	925
	Leu Gln Ser Pro Ala Val Lys Phe Ile Thr Asn Pro Glu Phe Phe Thr		
25	930	935	940

Val Leu His Ala Asn Tyr Ser Ala Tyr Arg Val Phe Thr Ser Ser Thr
945 950 955 960

Cys Leu Lys His Met Ile Leu Lys Val Arg Arg Asp Ala Arg Asn Phe
5 965 970 975

Glu Arg Tyr Gln His Asn Arg Asp Leu Val Asn Phe Ile Asn Met Phe
980 985 990

Ala Asp Thr Arg Leu Glu Leu Pro Arg Gly Trp Glu Ile Lys Thr Asp
10 995 1000 1005

Gln Gln Gly Lys Ser Phe Phe Val Asp His Asn Ser Arg Ala Thr Thr
1010 1015 1020

Phe Ile Asp Pro Arg Ile Pro Leu Gln Asn Gly Arg Leu Pro Asn His
15 1025 1030 1035 1040

Leu Thr His Arg Gln His Leu Gln Arg Leu Arg Ser Tyr Ser Ala Gly
20 1045 1050 1055

Glu Ala Ser Glu Val Ser Arg Asn Arg Gly Ala Ser Leu Leu Ala Arg
1060 1065 1070

Pro Gly His Ser Leu Val Ala Ala Ile Arg Ser Gln His Gln His Glu
25 1075 1080 1085

Ser Leu Pro Leu Ala Tyr Asn Asp Lys Ile Val Ala Phe Leu Arg Gln
1090 1095 1100

5 Pro Asn Ile Phe Glu Met Leu Gln Glu Arg Gln Pro Ser Leu Ala Arg
1105 1110 1115 1120

Asn His Thr Leu Arg Glu Lys Ile His Tyr Ile Arg Thr Glu Gly Asn
1125 1130 1135

10 His Gly Leu Glu Lys Leu Ser Cys Asp Ala Asp Leu Val Ile Leu Leu
1140 1145 1150

Ser Leu Phe Glu Glu Glu Ile Met Ser Tyr Val Pro Leu Gln Ala Ala
15 1155 1160 1165

Phe His Pro Gly Tyr Ser Phe Ser Pro Arg Cys Ser Pro Cys Ser Ser
1170 1175 1180

20 Pro Gln Asn Ser Pro Gly Leu Gln Arg Ala Ser Ala Arg Ala Pro Ser
1185 1190 1195 1200

Pro Tyr Arg Arg Asp Phe Glu Ala Lys Leu Arg Asn Phe Tyr Arg Lys
1205 1210 1215

25 Leu Glu Ala Lys Gly Phe Gly Gln Gly Pro Gly Lys Ile Lys Leu Ile

	1220	1225	1230
	Ile Arg Arg Asp His Leu Leu Glu Gly Thr Phe Asn Gln Val Met Ala		
	1235	1240	1245
5			
	Tyr Ser Arg Lys Glu Leu Gln Arg Asn Lys Leu Tyr Val Thr Phe Val		
	1250	1255	1260
	Gly Glu Glu Gly Leu Asp Tyr Ser Gly Pro Ser Arg Glu Phe Phe Phe		
10	1265	1270	1275 1280
	Leu Leu Ser Gln Glu Leu Phe Asn Pro Tyr Tyr Gly Leu Phe Glu Tyr		
	1285	1290	1295
15	Ser Ala Asn Asp Thr Tyr Thr Val Gln Ile Ser Pro Met Ser Ala Phe		
	1300	1305	1310
	Val Glu Asn His Leu Glu Trp Phe Arg Phe Ser Gly Arg Ile Leu Gly		
	1315	1320	1325
20			
	Leu Ala Leu Ile His Gln Tyr Leu Leu Asp Ala Phe Phe Thr Arg Pro		
	1330	1335	1340
	Phe Tyr Lys Ala Leu Leu Arg Leu Pro Cys Asp Leu Ser Asp Leu Glu		
25	1345	1350	1355 1360

Tyr Leu Asp Glu Glu Phe His Gln Ser Leu Gln Trp Met Lys Asp Asn
1365 1370 1375

Asn Ile Thr Asp Ile Leu Asp Leu Thr Phe Thr Val Asn Glu Glu Val
5 1380 1385 1390

Phe Gly Gln Val Thr Glu Arg Glu Leu Lys Ser Gly Gly Ala Asn Thr
1395 1400 1405

Gln Val Thr Glu Lys Asn Lys Lys Glu Tyr Ile Glu Arg Met Val Lys
10 1410 1415 1420

Trp Arg Val Glu Arg Gly Val Val Gln Gln Thr Glu Ala Leu Val Arg
1425 1430 1435 1440

Gly Phe Tyr Glu Val Val Asp Ser Arg Leu Val Ser Val Phe Asp Ala
15 1445 1450 1455

Arg Glu Leu Glu Leu Val Ile Ala Gly Thr Ala Glu Ile Asp Leu Asn
20 1460 1465 1470

Asp Trp Arg Asn Asn Thr Glu Tyr Arg Gly Gly Tyr His Asp Gly His
1475 1480 1485

Leu Val Ile Arg Trp Phe Trp Ala Ala Val Glu Arg Phe Asn Asn Glu
25 1490 1495 1500

Gln Arg Leu Arg Leu Leu Gln Phe Val Thr Gly Thr Ser Ser Val Pro
1505 1510 1515 1520

5 Tyr Glu Gly Phe Ala Ala Leu Arg Gly Ser Asn Gly Leu Arg Arg Phe
1525 1530 1535

Cys Ile Glu Lys Trp Gly Lys Ile Thr Ser Leu Pro Arg Ala His Thr
1540 1545 1550

10

Cys Phe Asn Arg Leu Asp Leu Pro Pro Tyr Pro Ser Tyr Ser Met Leu
1555 1560 1565

15

Tyr Glu Lys Leu Leu Thr Ala Val Glu Glu Thr Ser Thr Phe Gly Leu
1570 1575 1580

Glu
1585

20

<210> 2

<211> 6200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

<400> 2

5 ggttttttagg cctggccgcc atggcgtctc cttctagaaa ctcccagagc cgacgccggt 60
gcaaggagcc gctccgatac agctacaacc ccgaccagtt ccacaacatg gacctcagg 120
gcggcccccga cgatggcgtc accattcccc gctccaccag cgacactgac ctggtcacct 180
cggacagccg ctccacgctc atggtcagca gctcctacta ttccatcggg cactctcagg 240
acctggtcac ccactgggac ataaaggagg aagtggacgc tggggactgg attggcatgt 300
10 acctcattga tgaggtcttg tccgaaaact ttctggacta taaaaaccgt ggagtcaatg 360
gttctcatcg gggccagatc atctggaaga tcgatgccag ctctactttt gtggaacctg 420
aaactaagat ctgcttcaaa tactaccatg gagtgagtgg ggccctgcga gcaaccaccc 480
ccagtgtcac ggtcaaaaac tcggcagctc ctatttttta aagcattggg gctgatgaga 540
ccgtccaagg acaaggaagt cggaggtga tcagcttctc tctctcagat ttccaagcca 600
15 tgggggttgaa gaaagggatg tttttcaacc cagaccetta tctgaagatt tccattcagc 660
ctgggaaaca cagcatcttc cccgccctcc ctcaccatgg acaggagagg agatccaaga 720
tcataggcaa caccgtgaac cccatctggc aggccgagca attcagtttt gtgtccttgc 780
ccactgacgt gctggaaatt gaggtgaagg acaagtttgc caagagccgc cccatcatca 840
agcgcttctt gggaaagctg tcgatgcccg ttcaaagact cctggagaga cacgccatag 900
20 gggatagggt ggtcagctac acacttggcc gcaggcttcc aacagatcat gtgagtggac 960
agctgcaatt ccgatttgag atcacttcct ccatccaccc agatgatgag gagatttccc 1020
tgagtaccga gcctgagtca gcccaaattc aggacagccc catgaacaac ctgatggaaa 1080
gcggcagtg ggaacctcgg tctgaggcac cagagtcctc tgagagctgg aagccagagc 1140
agctgggtga gggcagtgtc cccgatcgtc cagggaacca aagcatagag ctttccagac 1200
25 cagctgagga agcagcagtc atcacggagg caggagacca gggcatggtc tctgtgggac 1260
ctgaaggggc tggggagctc ctggcccagg tgcaaaagga catccagcct gccccagtg 1320

cagaagagct ggccgagcag ctggacctgg gtgaggaggc atcagcactg ctgctggaag 1380
 acggtgaagc cccagccagc accaaggagg agcccttgga ggaggaagca acgaccaga 1440
 gccgggctgg aagggaagaa gaggagaagg agcaggagga ggaggagat gtgtccaccc 1500
 tggagcaggg agagggcagg ctgcagctgc gggcctcggt gaagagaaaa agcaggccct 1560
 5 gctccttgcc tgtgtccgag ctggagacgg tgatcgctc agcctgcggg gaccccgaga 1620
 ccccgcgac aactacatc cgcattcaca ccctgtgtca cagcatgcc tccgccagg 1680
 gcggcagcgc ggcagaggag gaggacggcg cggaggagga gtccaccctc aaggactcct 1740
 cggagaagga tgggctcagc gaggtggaca cgggtggcgc tgaccctct gccctggaag 1800
 aggacagaga agagcccgag ggggtactc caggcacggc gcaccctggc cactccgggg 1860
 10 gccacttccc cagcctggcc aatggcgagg cccaggatgg cgacacgcac cccagcaccg 1920
 ggagcgagag cgactccagc cccaggcaag gcggggacca cagttgcgag ggctgtgacg 1980
 cgtcctgctg cagcccctcg tgctacagct cctcgtgcta cagcacgtcc tgctacagca 2040
 gctcgtgcta cagcgctcg tgctacagcc cctcgtgcta caacggcaac aggttcgcca 2100
 gccacacgcg cttctcctcc gtggacagcg ccaagatctc cgagagcacg gtcttctcct 2160
 15 cgcaagacga cgaggaggag gagaacagcg cgttcgagtc ggtaccgcac tccatgcaga 2220
 gccctgagct ggaccggag tccacgaac gcgctgggcc gtggcaagac gagctggccg 2280
 cccctagcgg gcacgtggaa agaagcccg aaggtctgga atccccctg gcagggtcaa 2340
 gcaatcggag agaaggtgaa tgcctatac tccataattc ccagccagta agccagcttc 2400
 cttccctgag gcctgaacat catcactacc caacaatcga tgagcctctt ccacaaact 2460
 20 gggaagctcg aattgacagc cacgggcggg tcttttatgt ggaccacgtg aaccgcacaa 2520
 ccacctggca gcgtccgacg gcagcagcca cccggatgg catgcggaga tgggggtcca 2580
 tccagcagat ggagcaactc aacaggcgg atcaaaacat tcagcgaacc attgcaacag 2640
 agaggtccga agaagattct ggcagccaaa gctgcgagca agccccagca ggaggaggcg 2700
 gaggtggagg gactgactca gaagccgaat cttcccagtc cagcttagat ctaaggagag 2760
 25 aggggtcact ttctccagtg aactcacaaa aatcacctt gctgctgcag tccccagcgg 2820
 tcaagttcat caccaacccc gatttcttca ctgtgctaca tgccaattat agtgcctacc 2880

gagtcttcac cagtagcacc tgcttaaagc acatgattct gaaagtccga cgggatgctc 2940
gcaattttga acgctaccag cacaaccggg acttggtgaa tttcatcaac atgttcgcag 3000
acactcggct ggaactgccc cggggctggg agatcaaaac ggaccagcag ggaaagtctt 3060
ttttcgtgga ccacaacagt cgagctacca ctttcattga cccccgaatc cctcttcaga 3120
5 acggtcgtct tcccaatcat ctaactcacc gacagcacct ccagaggctc cgaagttaca 3180
gcgctggaga ggcctcagaa gtttctagaa acagaggagc ctctttactg gccaggccag 3240
gacacagctt agtagctgct attcgaagcc aacatcaaca tgagtcattg ccactggcat 3300
ataatgacaa gattgtggca tttcttcgcc agccaaacat ttttgaaatg ctgcaagagc 3360
gtcagccaag cttagcaaga aaccacacac tcaggagagaa aatccattac attcggactg 3420
10 agggtaatca cgggcttgag aagttgtcct gtgatgcgga tctggtcatt ttgctgagtc 3480
tctttgaaga agagattatg tctacgtcc cctgcaggc tgccttcac cctgggtata 3540
gcttctctcc ccgtgttca cctgttctt cacctcagaa ctccccaggt ttacagagag 3600
ccagtgcaag agccccctcc ccctaccgaa gagactttga ggccaagctc cgcaatttct 3660
acagaaaact ggaagccaaa ggatttggtc agggctcggg gaaaattaag ctcatattc 3720
15 gccgggatca tttgttgag ggaaccttca atcaggatgat ggcctattcg cggaaagagc 3780
tccagcgaaa caagctctac gtcacctttg ttggagagga gggcctggac tacagtggcc 3840
cctcgcggga gttcttcttc cttctgtctc aggagctctt caaccttac tatggactct 3900
ttgagtactc ggcaaatgat acttacacgg tgcagatcag ccccatgtcc gcatttgtag 3960
aaaaccatct tgagtggttc aggttttagcg gtcgcatcct gggtctggct ctgatccatc 4020
20 agtaccttct tgacgctttc ttcacgaggc ccttctacaa ggcactcctg agactgccct 4080
gtgatttgag tgacctggaa tatttgatg aggaattcca ccagagtttg cagtggatga 4140
aggacaacaa catcacagac atcttagacc tcactttcac tgtaaatgaa gaggtttttg 4200
gacaggtcac ggaaaggag ttgaagtctg gaggagccaa cacacaggtg acggagaaaa 4260
acaagaagga gtacatcgag cgcatgggtga agtggcgggt ggagcgcggc gtggtacagc 4320
25 agaccgaggc gctggtgcgc ggcttctacg aggttgtaga ctcgaggctg gtgtccgtgt 4380
ttgatgccag ggagctggag ctggtgatag ctggcacgcg ggaatcgac ctaaatgact 4440

ggcggaataa cactgagtac cggggagggtt accacgatgg gcatcttggt atccgctggt 4500
 tctgggctgc ggtggagcgc ttcaataatg agcagaggct gagattactg cagtttgtca 4560
 cgggaacatc cagcgtgccc tacgaaggct tcgcagccct ccgtgggagc aatgggcttc 4620
 ggcgcttctg catagagaaa tgggggaaaa ttactttctt cccaggga caccatgct 4680
 5 tcaaccgact ggatcttcca ccgtatccct cgtactccat gttgtatgaa aagctgttaa 4740
 cagcagtaga ggaaaccagc accttggac ttgagtgagg acatggaacc tcgcctgaca 4800
 ttttctggc cagtgcacac acccttcctg ggatgatccc cttttccctt tcccttaatc 4860
 aactctcctt tgattttggt attccatgat tttattttc aaaccaaacc aggattgaca 4920
 aaagctgtgc atgaagaact gccttcttct aagatctaac cttcaggctt ctctcctctg 4980
 10 ttttcaatga actgctagcc tgtatgcaat attaaaaaac agctgtctca aggtctgtgt 5040
 atatctccac atacctccat tactaacaat gaaatatgaa tgcaagttaa gctacacttg 5100
 accaaatggt aataaatggt tacttccatt tctatcattg aagggaataat gtgagcatta 5160
 agcactccag gctttcatat gcccatgtct tctgagcaga gccaccattt tttataattt 5220
 ctaataacca actccagaac taggagctga tcaactcttt gttttcctct ccatctactt 5280
 15 ttcctgtgc ataatatcca tccaaaggac aacagtggca aagctgaaat tttatacat 5340
 tcaactcatg attcacatgt ggcatcagtc ccatcagccg gaactagcct agacatacgg 5400
 tgcaaatatg acatttctaa cgattaacaa cagcaagaaa acacctgctg ctgatgcaat 5460
 gcaatgcac ccaatggttg tggggattgt gggctcaact caagagaagt ttaggagggg 5520
 gagcatccct agtgaatact cacaccacaa gaaggacaaa cttgtgcaca tgtccaagaa 5580
 20 agaaagcttc ttgattgagg tagcatgaag gatgaggctt cagcccccct tgtcttatgt 5640
 agaattgtgc aatgccaaact ggagaaaggg aagaaggaca tattaccttg gtttgaatcc 5700
 ctgagttctg tactgttctg tttgttttag tctagccaca gttcttcaca aaggaaaaaa 5760
 aaatgtgtag atgataccat gacttttggt aaagccatga cttttgtttg cttggcagac 5820
 aaaccctttt tttaaaactt tgatatTTTT tttcacatt tttttcctt ttcctttctt 5880
 25 aatcatggag ttcaagttcc ttgcatctg attgtccatc gggaccacac taggaagctg 5940
 cagagagtga tgggtcttgt tagggatcaa gggcaacata gtacttctcc ttcaccata 6000

gtaatcctcc tggggcagaa acataacacc ccaaaggcac gttgatttgt atcaaaataa 6060
atatccagtt tcttttagca ttcagtgaaa acatatctca gaaaacttca tgttgtcaga 6120
aaaacagctg caggctccaa agacagccta acctctcaac tacatttgaa ataaacccaa 6180
ccataatggt aaaaaaaaaa 6200

5

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic
polynucleotide

15

<400> 3

ctgcaccaac aatatccc

18

20 <210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic

polynucleotide

<400> 4

gtagagacag ggtttcac

7

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/52, C12Q1/02, G01N33/566, G01N33/50,
A61K38/44, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/52, C12Q1/02, G01N33/566, G01N33/50,
A61K38/44, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	WO 01/53312 A1 (Hyseq, Inc.), 26 July, 2001 (26.07.01), Full text & AU 200127284 A	1-4, 6/5, 7, 11-24
P, X/ P, A	WO 01/75067 A2 (Hyseq, Inc.), 11 October, 2001 (11.10.01), Full text & AU 200149251 A	1-4, 6/5, 7, 11-24
P, X/ P, A	WO 02/22660 A2 (Hyseq, Inc.), 21 March, 2002 (21.03.02), Full text & AU 200190548 A	1-4, 6/5, 7, 11-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 29 October, 2002 (29.10.02)	Date of mailing of the international search report 12 November, 2002 (12.11.02)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08524

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X/ P, A	WO 01/66733 A1 (Chiba-Ken, Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc.), 13 September, 2001 (13.09.01), Full text & JP 2001-245671 A1 & JP 2001-321175 A1	1-4, 6/5, 7, 11-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08524

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8-10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

It pertains to diagnostic methods to be practiced on the human body.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/68, C12N15/52, C12Q1/02, G01N33/566, G01N33/50, A61K38/44, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12Q1/68, C12N15/52, C12Q1/02, G01N33/566, G01N33/50, A61K38/44, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq

GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	WO 01/53312 A1 (HYSEQ, INC.) 2001.07.26, 全文 & AU 200127284 A	1-4, 6/5, 7, 11-24
PX/PA	WO 01/75067 A2 (HYSEQ, INC.) 2001.10.11, 全文 & AU 200149251 A	1-4, 6/5, 7, 11-24
PX/PA	WO 02/22660 A2 (HYSEQ, INC.) 2002.03.21, 全文 & AU 200190548 A	1-4, 6/5, 7, 11-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29.10.02

国際調査報告の発送日

12.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4B

3131

電話番号 03-3581-1101 内線 3447

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX/PA	WO 01/66733 A1 (千葉県、久光製薬株式会社) 2001.09.13 全文 & JP 2001-245671 A1 & JP 2001-321175 A1	1-4, 6/5, 7, 11-24

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
人間の診断方法である。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.